

氏名 (本籍)	橋 本 安 弘 (大阪府)
学 位 の 種 類	博 士 (医学)
学位授与番号	乙第 1046 号
学位授与日付	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	チフス菌のVi抗原遺伝子とその発現調節に関する研究 (I) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of ViaB region encoding Vi antigen in <i>Salmonella typhi</i> . (II) Positive autoregulation of <i>vipR</i> expression in ViaB region-encoding Vi antigen of <i>Salmonella typhi</i> .
審 査 委 員	(主査) 教授 江 崎 孝 行 (副査) 教授 岡 野 幸 雄 教授 渡 邊 邦 友

論 文 内 容 の 要 旨

チフス菌はグラム陰性の桿菌であり、ヒトにのみ自然感染し腸チフスをひこおこす。腸チフスは現在でも開発途上国では年間数百万人が感染する公衆衛生上重要な感染症であり、菌の病原因子を解析し有効なワクチンを開発することが望まれている。

チフス菌の病原性は腸管上皮細胞への侵入性と食細胞内での増殖性にある。近年、分子生物学の発展や培養細胞を用いた感染実験系の開発により、侵入性および増殖性を支配する蛋白や菌体成分が同定されつつある。これら病原因子のなかで、莢膜を形成するVi抗原は血清や食細胞内の殺菌作用に抵抗する病原因子としてはやくから注目され、また腸チフスの成分ワクチンとしても期待されてきた。しかしまだVi抗原産生に必要な遺伝子群は同定されておらずViの詳細な機能解析は行われてこなかった。

申請者はVi抗原の機能を明確にする目的でVi抗原遺伝子を解析しその発現制御機構を明かにした。

実験方法

- 1) チフス菌のgenomic DNAからコスミドライブラリーを作製した。抗原抗体反応を用いてVi陽性となった大腸菌を同定することによりVi抗原遺伝子をクローニングした。
- 2) クローニングした領域を制限酵素で適当なサイズに切断しpKSIIにサブクローニングした。Exonuclease III処理によりインサートを段階的に欠失させた一連のプラスミドを作製し、オートシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。
- 3) 常法に従いトランスポゾン挿入変異株を作製し各遺伝子の機能を解析した。
- 4) *in vitro*転写翻訳系またはT7 RNAポリメラーゼ系で遺伝子産物を特異的に発現させSDS-PAGEで分析した。
- 5) Viの発現制御機構の解析
相同性組み換えを利用してVi抗原遺伝子群の先頭に位置する*vipR*遺伝子内にレポーター遺伝子(クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を導入した。このレポーター遺伝子の発現をモニターすることで*vipR*上流のプロモーター活性を測定し発現制御機構を解析した。Band-shift assayにより*vipR*産物のDNA結合能を決定した。
- 6) 血清抵抗性試験

Vi陽性及び陰性のisogenic strainsを作製し、Vi抗原の有無による血清抵抗性の違いを調べた。健常人から得た血清にそれぞれの菌液を混合し一定時間保温後サンプリングし発育コロニー数から生残菌数を求めた。

結果と考察

- 1) チフス菌の病原因子であるVi抗原遺伝子のクローニングに成功し、大腸菌においてVi抗原を大量生産できる系を確立した。
- 2) Vi抗原遺伝子はチフス染色体上の14-kbにもおよぶ領域を占め、10の遺伝子から構成されていた。これらの遺伝子群はVi抗原の発現調節 (*vipR*)、生合成 (*vipA*, *vipB*, *orf4*, *vipC*)、菌体表面への輸送と英膜形成 (*vexA*, *vexB*, *vexC*, *vexD*, *vexE*) に関与していた。特に輸送に関する遺伝子群は*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*など他の病原菌の英膜遺伝子と相同性を持ちこれらの英膜遺伝子は共通の先祖遺伝子から発生したと考えられた。
- 3) *vipR*産物によるVi抗原のユニークな発現制御機構を明かにした。
*vipR*はVi抗原遺伝子群の先頭に位置する遺伝子であり、下流に存在する*vipAB*の生合成遺伝子とオペロンを形成していた。またこの*vipR*遺伝子の発現は*vipR*蛋白自身によって正に調節されており、一度*vipR*プロモーターが活性化されると*vipR*産物の量が急速に増加し、他の転写活性化因子 (*rcsB*) の協力なしにVi抗原の産生を一時的に促進させることを示した。またDNA結合実験により*vipR*産物が直接その上流の調節領域に結合することを示した。
- 4) Vi抗原の発現は環境因子によって厳密に制御されていた。Vi抗原は37℃で最も強く発現されたが20℃ではまったく産生されなかった。またその発現は浸透圧にも依存しており0.85% NaCl濃度で最大であった。更にこれらの発現調節は主として*vipR*の転写段階で行われていた。生体内ではこれらの環境因子が最初に引き金となって*vipR*プロモーターを活性化し、続いて*vipR*自身による増幅回路が働きVi抗原の産生が安定に維持されるものと考えられた。
- 5) クローニングした遺伝情報をもとにVi抗原のisogenic strainsを作製した。Vi陰性株は血清中の補体により容易に溶菌されたが、Vi陽性株は溶菌されずVi抗原はチフス菌が血清中で増殖するための不可欠な因子であることがわかった。

論文審査の結果の要旨

申請者橋本安弘はチフス菌の病原因子であるVi抗原の発現に必要な領域の全塩基配列を決定し、その合成、輸送、発現に関する全遺伝子を命名した。またVi抗原のきわめてユニークな発現調節機構を分子生物学的に解明した。

この研究は細菌の病原性および食細胞内寄生細菌の感染機構の解明に貴重な貢献をしたと認める。

[主論文公表誌]

チフス菌のVi抗原遺伝子とその発現調節に関する研究

- (I) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of *ViaB* region encoding Vi antigen in *Salmonella typhi*.

J. Bacteriol. 175 (14) : 4456~4465, 1993

- (II) Positive autoregulation of *vipR* expression in *ViaB* region-encoding Vi antigen of *Salmonella typhi*.

J. Bacteriol. 178 (5) : in press, 1996