

氏 名	ムハメッド カムルザマン Muhammad Kamruzzaman
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3215 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Detection and characterization of a functional insertion sequence, ISVpa2, in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (腸炎ビブリオにおいて機能を有する挿入配列 ISVpa2 の検出および特性の解明)
論文調査委員	(主 査) 教 授 光 山 正 雄 教 授 松 岡 雅 雄 教 授 小 泉 昭 夫

論 文 内 容 の 要 旨

挿入配列（以下 IS と略す）は、比較的短く、自身で移動する能力のある塩基配列で、細菌のゲノム中に広く分布し、付近の遺伝子の変異や各種構造変化、抗生物質耐性や病原性決定因子の菌種内・菌種間移動、および遺伝子発現の変化を引き起こす可能性があると考えられている。しかし、既報の IS の多くは、塩基配列から推定されたもので、トランスポジション活性が実験的に証明されたものは少ない。ビブリオ属細菌には 48 菌種が報告されているが、7 菌種において 18 種の IS の存在が報告されており、その多くは病原因子遺伝子の解析との関連性から見いだされている。しかし、その中で、トランスポジション活性が実際に証明されたものは、コレラ菌の IS1358 のみである。腸炎ビブリオは、海洋性細菌で魚介類の汚染を介してヒトに胃腸炎をおこすが、特に近年出現した新型クローンによる世界的大流行が問題になっている。本研究では、世界的大流行菌株のマーカー遺伝子を解析中に IS と思われる塩基配列を検出したので、その構造を解析し、トランスポジション活性を証明するとともに、腸炎ビブリオおよび類縁菌中の類似 IS を検索・解析して、腸炎ビブリオの病原性や菌の進化に関する研究におけるこの IS の重要性について考察した。

全ゲノム配列が報告されている腸炎ビブリオ KX-V237 株について、世界的大流行菌株に特異的な各種の遺伝マーカーを PCR 法によって検索した。標的遺伝子の 1 つについては、予想より大きな増幅産物が得られたので、クローン化して解析したところ標的遺伝子中に挿入された 1,243-bp の塩基配列が検出された。この塩基配列は、IS3 ファミリーに属する IS に特徴的な構造(2つのオーバーラップする ORF 間のフレームシフトによるトランスポゼースの発現およびその活性発現に必要なドメイン構造など)をコードしていた。この IS を ISVpa2 と命名した。文献に報告されている KX-V237 株の全ゲノム配列中には、ISVpa2 の配列は 1 コピーしか検出されなかったが、研究室のストック菌株を、サザンブロット法によって解析したところ、3 コピーの ISVpa2 が検出され、さらに培養を継続した後に 4 コピーの ISVpa2 が含まれる菌株を検出した。これらの ISVpa2 コピーおよび周辺領域の塩基配列を解析した結果、菌の増殖中に複製された ISVpa2 が、ゲノムの様々な位置に挿入し、それにともなって、挿入した遺伝子の不活性化、周辺領域の欠失などの遺伝的变化がおこっていることが明らかになった。また腸炎ビブリオ 62 菌株を調べたところすべてに ISVpa2 が検出できたのに対し、ビブリオ属細菌 28 菌種 138 菌株のうち、3 菌種の一部の菌株に ISVpa2 に類似する塩基配列(98~86%の相同性)が検出された。

以上のことから、ISVpa2 は腸炎ビブリオで初めて発見されたトランスポジション活性のある IS で、すべての腸炎ビブリオに分布していると言える。ISVpa2 のトランスポジション活性は非常に高く、通常の菌の培養中にも活性を発現し、ゲノムの様々な位置で遺伝子構造の変化や遺伝子発現の変化を起こす可能性があり、菌の病原性に関連する遺伝子への影響も十分考えられるので、分離菌の病原性の解析において注意する必要がある。また ISVpa2 は、ビブリオ属菌種間で移動している可能性も考えられ、これらの菌種における新型菌の出現や進化に関係している可能性も考えられる。

論文審査の結果の要旨

挿入配列 (IS) は、細菌のゲノム中に分布し、移動する能力のある塩基配列で、遺伝子の変異や各種構造変化、抗生物質耐性や病原性決定因子の移動なども引き起こす可能性があると考えられているが、活性が実験的に証明されたものは少ない。腸炎ビブリオは、ヒトに胃腸炎をおこすが、特に近年出現した新型クローンによる世界的大流行が問題になっている。本研究では、世界的大流行菌株のマーカ―遺伝子中に IS の挿入がおこることを発見した。その IS をクローン化して解析したところ、IS3 ファミリーの特徴的な構造を有することを明らかにし、この IS を ISVpa2 と命名した。ストック菌株中および培養後の菌株中の ISVpa2 を検出・解析し、既報の全ゲノム配列と比較した結果、菌の増殖中に複製された ISVpa2 が、遺伝子への挿入および周辺領域の欠失をおこしていることが証明できた。また腸炎ビブリオ菌株すべてと一部のビブリオ属細菌種に ISVpa2 が検出できた。以上のことから、ISVpa2 は腸炎ビブリオで初めて発見されたトランスポジション活性のある IS で、活性は非常に高く、PCR 検査のみならず、菌の病原性発現、新型菌の出現や進化に影響を与える可能性も考えられる。

以上の研究は、新型クローンによる感染症の国際的伝播の解明に貢献し、腸管感染症の疫学と病原細菌の遺伝学の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。