

氏 名	なか ぐち よし つぐ 中 口 義 次
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2610 号
学位授与の日付	平 成 15 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	The urease gene cluster of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> does not influence the expression of the thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH-related hemolysin gene (腸炎ビブリオのウレアーゼ遺伝子群は耐熱性溶血毒 (TDH) および TDH 類似溶血毒の発現に影響を与えない)
論文調査委員	(主 査) 教 授 光 山 正 雄 教 授 一 山 智 教 授 西 淵 光 昭

論 文 内 容 の 要 旨

腸炎ビブリオは、我が国でもっとも重要な食中毒原因菌の一つで、海産物の摂食を介して人に急性胃腸炎を引き起こす。腸炎ビブリオの主たる病原因子は、耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin, TDH) および TDH 類似溶血毒 (TDH-related hemolysin, TRH) であり、これらをコードする *tdh* 遺伝子と *trh* 遺伝子の一方または両者を保有する菌株が病原性株であるとされる。これらの毒素遺伝子の発現レベルは、菌のビルレンスに影響するので、発現に影響を及ぼす種々のメカニズムを明らかにする必要がある。腸炎ビブリオの一部にはウレアーゼ産生能を有するものがあり、それらは必ず *trh* 遺伝子陽性で、さらにその一部には *tdh* 遺伝子を併せ持つものもある。神奈川現象 (我妻培地で強い溶血活性) を呈し *tdh* 遺伝子を保有する菌株での TDH 産生レベルに比べて、*trh* 遺伝子のみを保有する菌株での TRH 産生レベルはかなり低い。またウレアーゼ産生能を有し、*trh* 遺伝子と *tdh* 遺伝子の両方を保有する菌株では、TDH の産生レベルも TRH の産生レベルも低い。そこで本研究では、ウレアーゼ産生能またはウレアーゼ遺伝子群の存在が *trh* 遺伝子と *tdh* 遺伝子の低レベル発現と関係しているか否かを明らかにした。

tdh 遺伝子には5種類 (*tdh1*-*tdh5*)、*trh* 遺伝子には2種類 (*trh1*, *trh2*) のバリエーションが報告されている。TDH を高レベルに産生する神奈川現象陽性株の保有する2つの *tdh* 遺伝子 (*tdh1*, *tdh2*) および *trh1* と *trh2* 遺伝子のそれぞれの転写レベルをモニターするために、それぞれの毒素遺伝子と *lacZ* 遺伝子の融合遺伝子を作成した。これら大腸菌および神奈川現象陽性腸炎ビブリオ菌株の染色体中に組み込んで、融合遺伝子の転写レベルを比較した。各種毒素-*lacZ* 融合遺伝子の転写レベルの中では、*tdh2* 遺伝子が最も高く、その他の遺伝子と比較して大腸菌および腸炎ビブリオ内でそれぞれ60-130倍、4-6倍であった。また、それぞれの融合遺伝子について大腸菌内と腸炎ビブリオ内で転写レベルに顕著な差があることから、腸炎ビブリオ内では、毒素遺伝子に影響を与える何らかのメカニズムが存在することが示唆された。次に、ウレアーゼ遺伝子群の存在またはその発現が毒素遺伝子の発現に何らかの影響を与えているかどうかを検討するために、腸炎ビブリオのウレアーゼ遺伝子群をプラスミド上にクローン化し、融合遺伝子を組み込んだ大腸菌および腸炎ビブリオに導入して、融合遺伝子の転写レベルを測定し、対照 (プラスミドのみの場合) と比較した。その結果、導入したウレアーゼ遺伝子群は大腸菌内のみならず腸炎ビブリオ内でもいずれの融合遺伝子の転写にまったく影響を与えないことが示された。したがって、ウレアーゼ遺伝子群の存在またはその発現が *tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子の転写に直接作用する可能性あるいは腸炎ビブリオ内の何らかの転写調節因子を介して間接的に影響を及ぼす可能性が否定された。またウレアーゼ遺伝子群を導入した神奈川現象陽性株では TDH (蛋白) の産生量に変化がなかったことから、転写以外のメカニズムを介した影響もないと判断された。以上の結果からウレアーゼ産生能を有する菌株での *tdh* 遺伝子と *trh* 遺伝子の低レベル発現にはウレアーゼ遺伝子群が関与せず他の何らかのメカニズムが関与していると結論できた。

論文審査の結果の要旨

我が国における重要な食中毒原因菌である腸炎ビブリオの主たる病原因子は、耐熱性溶血毒（TDH）および TDH 類似溶血毒である。これらの毒素遺伝子の発現レベルは菌のピルレンスに影響するので、発現に影響を及ぼす種々のメカニズムを明らかにする必要がある。腸炎ビブリオの一部にはウレアーゼ産生能を有するものがあり、ウレアーゼ産生能またはウレアーゼ遺伝子群の存在が毒素遺伝子の低レベルな発現と関係している可能性が示唆されているので、本研究ではこの点を明らかにした。

毒素遺伝子とレポーター遺伝子との融合遺伝子を作成し、大腸菌および腸炎ビブリオ菌株内に組み込んだ。さらに、腸炎ビブリオのウレアーゼ遺伝子群をクローン化し、融合遺伝子を組み込んだ大腸菌および腸炎ビブリオに導入して、転写レベルへの影響を比較した。その結果、ウレアーゼ遺伝子群の存在またはその発現が毒素遺伝子の転写に直接作用する可能性あるいは腸炎ビブリオ内の何らかの転写調節因子を介して間接的に影響を及ぼす可能性が否定された。またウレアーゼ遺伝子群を導入後でも耐熱性溶血毒の蛋白産生量に変化がなかったことから、転写以外のメカニズムを介した影響もないと判断された。以上の結果からウレアーゼ産生能を有する菌株での毒素遺伝子の低レベルな発現にはウレアーゼ遺伝子群が関与せず他の何らかのメカニズムが関与していると結論できた。

以上の研究は、腸炎ビブリオの病原性の解明に貢献し、病原細菌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15年2月20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。