

氏名(本籍)	た 田	なか 中	あき 暁	のり 典	(三重県)
学位の種類	博士(農学)				
学位記番号	博甲第3725号				
学位授与年月日	平成17年3月25日				
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当				
審査研究科	生命環境科学研究科				
学位論文題目	反芻獣病原細胞 <i>Histophilus somni</i> の分離宿主と関連した遺伝的多様性に関する研究				
主査	筑波大学教授	農学博士	星野	貴行	
副査	筑波大学助教授	農学博士	中村	顕	
副査	筑波大学教授	農学博士	金井	幸雄	
副査	筑波大学教授	農学博士	内山	裕夫	

論文の内容の要旨

ウシ由来病原細菌 *Haemophilus somnus* やヒツジ由来病原細菌 *Haemophilus agni* 及び *Histophilus ovis* は髄膜脳脊髄炎、肺炎、生殖器疾患など様々な疾病を引き起こすグラム陰性細菌であり、健康動物の鼻腔及び生殖器からも分離される。これまでの分類学的な研究により *H.somnus*、*H.agni* 及び *H.ovis* は同一の菌群に属することが示唆されていたが、最近、これらの反芻獣由来病原細菌に対して新菌種名 *Histophilus somni* が提唱された。一方で、疾病由来株には免疫グロブリン結合能や新鮮血清による殺菌作用への抵抗性が認められるが、健康牛生殖器由来株のなかにはこれらの性状を示さない菌株が存在すること、DNA-DNA ハイブリダイゼーション、制限酵素断片長多型、外膜タンパク質プロファイル、DNA フィンガープリンティング等の解析結果は分離宿主に関連したサブグループの存在を示唆すること等が報告されてきた。しかし、*H.somni* の分離宿主に関連した遺伝的多様性の存在については明確にされていなかった。

本研究は、*H.somni* 菌株間の分離宿主と関連した遺伝的多様性を明らかにすることを目的として行われた。

まず、*H.somni* 菌株間の系統分類学的な関連性を明らかにするために、ウシ分離株 25 株とヒツジ分離株 6 株の 16S rDNA と *rpoB* の塩基配列を決定した。その結果、16S rDNA の塩基配列には 99.4% 以上の相同性が認められ、これらの株が同一の分類群に属することがわかった。*rpoB* の塩基配列の系統樹解析からは、ヒツジ分離株はサブグループを形成することが明らかとなった。また、決定した 311 bp の *rpoB* 塩基配列中の 2 塩基はウシ及びヒツジ分離株間で異なり、そのうちの 1 塩基は制限酵素 *Hinc* II 認識部位の形成に関与していた。PCR 増幅した *rpoB* DNA の *Hinc* II 切断を実施した結果、46 株のウシ分離株はいずれも切断されなかったが、ヒツジ分離株では 20 株中 17 株 (85%) で切断されたことから、*Hinc* II 切断部位の有無は菌株の分離宿主と関連するマーカーとして有用であることが明らかとなった。

H.somni 肺炎由来 2336 株ゲノム DNA ライブラリーから実験感染牛回復期血清との反応性により選択されたコスミドクローン pHS1 のインサート内には血清抵抗性に関与する 76kDa の表面抗原 P76、免疫グロブリン結合タンパク質 (IbpA) とその菌体外輸送を担う関連タンパク質 (IbpB) の遺伝子領域が存在する。一方で健康牛包皮腔由来株の中には p76、*ibpA* 及び *ibpB* 遺伝子相当領域が欠失している 129Pt 株が存在する。*H.somni* の菌株間で明瞭な違いの存在する pHS1 インサート領域を菌株間の多様性を検索する領域として選

び、その全塩基配列36, 314 bpを決定した。その結果、*ibpA*遺伝子の約5kb下流の相補鎖上に新たな遺伝子配列(6,540 bp)を見出し、その推定アミノ酸配列には菌体表面フィブリル構造タンパク質Hsfと24%の相同性が認められた。その構造と機能の共通性からHsfは菌体表面付着因子YadAファミリーに属することが知られており、新規遺伝子配列はYadAファミリーに共通のC末端構造を持つことから、この遺伝子を*hsf*と命名した。129Pt株のゲノム配列とpHS1インサートDNAの塩基配列の比較によって、129Pt株の*hsf*遺伝子相当領域は4つの遺伝子配列*cadB* (lysine/cadaverine transporter), *cadA* (lysine decarboxylase), *lysRS* (Lysyl-tRNA synthetase) 及び*iciA* (replication initiation inhibitor) に置換していることが確認されたが、pHS1インサートDNA及び129Pt株の相当領域にはいずれもトランスポゾンなどの挿入配列は認められなかった。

次にpHS1インサートDNA相当領域及び129Pt株の*cadBA*領域を11カ所の領域に分けたプローブを作製し、16SrDNA及び*rpoB*遺伝子解析に用いた*H.somni* 31株についてサザンハイブリダイゼーションを行うとともに、遺伝子配列間領域のPCR増幅によりpHS1インサートDNA相当領域の保存性を解析した。その結果、*ibpBA*領域を欠損している株は129Pt株と1P株の2株のみであり、その他の株はすべて*ibpBA*領域を保有していた。*hsf*領域を保有する株(*hsf*型)はウシ分離株の25株中18株(72%)に認められたが、*cadBA*領域を保有する株(*cadBA*型)は25株中7株(28%)であった。一方、ヒツジ分離株6株はすべて*cadBA*型であった。*hsf*領域と*cadBA*領域の分布には菌株の分離宿主と関連した多様性の存在が示されたため、さらにウシ由来株21株及びヒツジ由来株14株について*hsf*及び*cadBA*型別を試みた結果、ウシ由来株では21株中16株(76%)が*hsf*型、21株中5株(24%)が*cadBA*型であったが、ヒツジ由来株はすべて*cadBA*型であった。また、ウシ由来供試菌株46株から症例が未同定の3株を除く43株について疾病由来株と健康牛由来株ごとの*hsf*型菌株の分布をみると、疾病由来株では23株中21株(91%)、健康牛由来株では20株中12株(60%)が*hsf*型であり、*hsf*型菌株の分布陽性率には疾病由来株と健康牛由来株の間で有意差が認められた。

pHS1インサートDNA領域の病原性関連遺伝子について各菌株での発現状況を確認するため、2336株の*ibpB*及び*hsf*の塩基配列を利用して大腸菌高発現系を作出し、それぞれの発現産物に対するウサギ免疫血清を作製した。*IbpB*免疫血清を用いたウェスタンブロットにより、2336株を含む供試菌株11株(ウシ由来株9株及びヒツジ由来株2株)全てに60 kDaの単一の*IbpB*抗原バンドが検出されるとともに、2336株のサルコシル不溶性外膜画分に*IbpB*が含まれることが確認された。*Hsf*免疫血清を用いたウェスタンブロットでは2336株を含む供試菌株31株(ウシ由来株25株及びヒツジ由来株6株)中1株(髄膜脳脊髄炎由来株0289株)においてのみ200 kDa以上の高分子量の抗原バンドが確認された。なお、2336株の培養菌体(対数増殖期)からRNAを抽出し、*hsf*領域を対象としたRT-PCRを実施したところ、*hsf*遺伝子からのmRNAが検出された。2336株において*hsf*遺伝子の転写は起きているが、*Hsf*免疫血清と反応する高分子量の抗原バンドが検出されない点についてさらに検討が必要であるとともに、*Hsf*関連抗原の検出が極く少数の株にのみ認められたことから、*Hsf*の*H.somni*病原性関連遺伝子としての意義についても検討を加えていく必要がある。

審査の結果の要旨

本研究により、*H.somni*には分離宿主に依存した遺伝的多様性が存在することが明らかとなった。さらに、ウシ型・ヒツジ型を区別する簡便な手法を開発したことは高く評価できる。病原性に関係する遺伝子を明らかにしたことの意義も大きく、新規病原関連遺伝子の病原性発現に果たす役割の解明につながることを期待される。

以上のように、本研究はウシ・ヒツジに様々な疾病を惹き起こす病原細菌*H.somni*に関して、基礎及び疾病対策の両面から多くの知見を明らかにした。したがって得られた成果の役割は大きいと判断する。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。