

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
原田文植	主査 教授 佐野 浩一 副査 教授 林 秀行 副査 教授 清水 章 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 鈴木 廣一
主論文題名 RNA-dependent DNA Polymerase (RT) Activity of Bacterial DNA Polymerases (細菌の DNA ポリメラーゼがもつ逆転写酵素活性)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>逆転写反応は RNA を鋳型とし DNA を合成する反応であり、この反応を触媒する逆転写酵素 (RT) は HIV などのレトロウイルスが保有している。細菌では、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の断片である Klenow fragment (KF) にこの酵素と同じ活性が存在することが知られており、KF と HIV RT は高次構造に多くの類似点を有しているとされている。さらに、HIV RT 阻害剤である Azidothymidine (AZT) が一部のグラム陰性桿菌の増殖を抑制すると報告されている。これらの事実から、RT 阻害剤で増殖抑制を受ける細菌は RT 活性を示す酵素を持っているのではないかと考えた。そこで、AZT で増殖抑制を受ける細菌が RT 活性を示す酵素を持っていることを明らかにし、その酵素の RT 活性が AZT にて抑制されることを明らかにしようとした。また、逆転写酵素阻害抗体を用いたレトロウイルスの型決定法と同様の菌種決定法の確立に関する可能性を探ることを目的とした。</p> <p>《材料と方法》</p> <p><u>細菌とライセートの抽出</u>: <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)、<i>Shigella sonnei</i> I (<i>S. sonnei</i> I)、<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 (<i>V. cholerae</i> non-O1)、<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>)、<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) の 5 菌種を、HIB 液体培地で 37°C 一夜培養し、ガラスビーズを含むリン酸緩衝化生理食塩水内でボルテックスをかけ粗破碎し、遠心した。その上清を氷中で超音波処理し、再度遠心処理した上清を用いた。</p> <p><u>ポリメラーゼアッセイ</u>: RT 及び DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ (DDDP) 活性は非放射性アッセイ法を用いて測定した。</p> <p><u>Anti-KF 抗体の作製</u>: 家兎に 0.2 mg の KF を皮下注射し、ウエスタンブロットで KF に対する特異抗体の産生が確認された時点で全採血し、分離した血清を anti-KF 抗体として以下の実験に用いた。</p> <p>《結果と考察》</p> <p>本実験のアッセイ系で KF の RT 及び DDDP 活性を測定したところ、時間依存的、濃度依存的に増加するシグナルが確認され、大腸菌ライセートでも同様のシグナルが確認できた。そこでこの系で細菌</p>	

の酵素活性を測定することができると考え、5 菌種の酵素活性を測定したところ、AZT による増殖抑制の有無に関わらず、全ての細菌に RT 活性を認めた。この系で検出された RT 活性が retron RT でないことを明らかにするために retron 陽性 *V. cholerae* と retron 陰性 *V. cholerae* の RT 及び DDDP 活性を測定した。その結果、retron 陰性の *V. cholerae* で高い RT/DDDP 比を得たため、本系では retron RT を検出できないと考えた。そこで、AZT で増殖抑制された細菌の RT 活性は AZT によって阻害されるのではないかと考え、5 菌種の RT 活性に対する活性型 AZT である AZT 三リン酸の阻害効果を調べた。その結果、大腸菌ライセート中の RT、DDDP 両活性に阻害効果を示す 1000 μ M AZT 三リン酸は *S. sonnei* I、*V. cholerae* non-O1、*P. aeruginosa* の RT 活性を阻害し、*S. aureus* の RT 活性は阻害しなかった。*P. aeruginosa* では AZT 三リン酸にて RT 活性が阻害されたにも関わらず、AZT にてその増殖が抑制されなかった理由のひとつとして同細菌が持つ多剤排泄機構や thymidine kinase の特性が関与していると考えられた。

以上、細菌にも RT 活性を示す酵素が存在することが確認できたので、逆転写酵素阻害抗体を用いたレトロウイルス型決定法に類似した菌種決定に応用できるのではないかと考えた。そこで、KF で免疫した家兎血清 (anti-KF 抗体) を作製し、5 菌種の細菌ライセートの RT、DDDP 活性阻害率を調べた。HIV における型決定法に従って、50%以上の阻害率をもって有意な阻害であると判定した。大腸菌では両活性ともに anti-KF 抗体によって有意に阻害された。分類学上大腸菌と同じ *Escherichia* に属する *S. sonnei* I でも RT 活性と DDDP 活性が有意に阻害された。それに対して今回調べた他の細菌において anti-KF 抗体にていずれの活性も阻害されなかった。これらの結果より、細菌においてウイルスと同様に、菌種特異性を示す RT 阻害抗体を作製できることが明らかになった。

現在、細菌の核酸合成を阻害する薬剤としてジャイレース阻害剤であるキノロン系抗菌剤が確立されているが、DNA ポリメラーゼそのものの活性を阻害する抗菌剤は実用化されていない。RT 阻害剤は細菌 DNA ポリメラーゼの RT 活性に関わる部分に作用してその増殖を抑制しているのではないかと考えられ、この細菌 DNA ポリメラーゼが新たな抗菌剤のターゲットになりうると考えた。またレトロウイルスでは RT 活性を特異的に阻害する抗体が報告され、型決定に応用されている。細菌においても RT 阻害抗体の作製が可能で、この抗体が菌種特異性を有することから、この特異的 RT 阻害抗体を用いた細菌同定の新たな方法論確立の可能性が示された。本研究は細菌の RT 活性の本体を明らかにすることにより新たな研究分野を提供したものと考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	原 田 文 植
論文審査担当者		主 査 教授 佐 野 浩 一 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 清 水 章 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 鈴 木 廣 一	
主論文題名 RNA-dependent DNA Polymerase (RT) Activity of Bacterial DNA Polymerases (細菌の DNA ポリメラーゼがもつ逆転写酵素活性)			
論 文 審 査 結 果 の 要 旨			
<p>大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の断片である Klenow fragment (KF) が HIV 逆転写酵素 (RT) 類似の高次構造を示し、RT 活性を有すること、及び大腸菌を含む一部のグラム陰性桿菌の増殖が HIV RT 阻害剤にて抑制されることが知られている。これらのことから、申請者は一部の細菌は RT 活性を示す DNA ポリメラーゼをもつ可能性を想定し、5 菌種の細菌の可溶化上清中の RT 活性を測定した。その結果、Azidothymidine (AZT) による増殖抑制の有無に関わらず、調べた細菌すべてに RT 活性を認めた。これらの活性のうち例外はあるものの AZT にて増殖抑制される細菌の RT 活性が AZT の活性型である AZT 三リン酸にて阻害されることから、RT 活性を示す細菌 DNA ポリメラーゼは抗菌剤のターゲットになりうると考えている。</p> <p>さらに申請者は、KF を家兔に免疫して得た anti-KF 抗体を用いて 5 菌種の細菌における DNA 合成酵素活性阻止試験を行い、大腸菌及び、分類学上 <i>Escherichia</i> に属する赤痢菌においてのみ RT、DDDP 両方の活性ともに有意に阻止されることを見出している。以上のことから anti-KF 抗体の菌種特異性を用いた新たな菌種同定法開発の可能性を示すものである。</p> <p>本研究は、細菌 DNA ポリメラーゼをターゲットとした抗菌剤の開発やその阻止抗体を用いた細菌同定法の開発など新たな研究分野を提供するものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌) Bulletin of the Osaka Medical College 51(1): 35-41, 2005			