

Title	ジフテリア菌における毒素蛋白質の合成部位
Author(s)	内田, 驍
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29114
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 10 】

氏名・(本籍)	内 田 驍 うち だ つよし
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 1 4 5 号
学位授与の日付	昭 和 42 年 3 月 28 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ジフテリア菌における毒素蛋白質の合成部位
論文審査委員	(主査) 教 授 米 田 正 彦 (副査) 教 授 天 野 恒 久 教 授 川 俣 順 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

ジフテリア毒素は菌体外蛋白質の代表的なものの一つであり、その毒素蛋白の菌体外産生機構は、溶菌によるものではなく、生菌によって *de novo* に合成されて産生される。最近我々の教室で、菌体の発育が極度に抑制された培養系で、発育時の毒素産生率と変わらずに毒素を産生する培養系が開発された。

この実験の目的は、この単純化された培養系を用いて、ジフテリア毒素がアミノ酸から合成され菌体外へ出現するまでの時間、及びその毒素合成に関与している菌体構造を明らかにするところにある。

〔方法ならびに成績〕

使用したジフテリア菌は、P.W. No. 8 Biken 株。

培養方法は、発育が極度に抑制されているが毒素産生率の変らない培養系を用いて行なった。以下アイソトープラベルはすべてこの系で *in vivo* で行なわれたものである。なお放射能活性の測定は Aloka low bock counter を使用した。

(1) ジフテリア毒素蛋白の合成速度

毒素が培地中のアミノ酸から合成されて菌体外へ放出される迄に何分間を必要とするかを、¹⁴C アミノ酸の pulse ラベル及び pulse and chase ラベルにより得た培養液を十分透析した後、結晶毒素から調製した Toxoid で免疫して得た家兎抗毒素血清で沈降させ、それ等の特異沈降物のカウントを測定して計算した。その結果約3分間であった。又 ¹⁴C アミノ酸を添加後30秒間隔の kinetics を行ないラベルされた毒素の菌体外への出現をみたが lag はみられなかった。

(2) 菌体の分画とその放射能比活性及び毒性

3分間以内で pulse ラベルされた菌を破壊しその破壊物について、各画分を出来るだけ同時に比較観察したいために、50%~70%の蔗糖を底に置いた蔗糖密度勾配法 10%~30% によって分画した。その結果、膜、リボソーム、及上清の三面分を得た。これら各画分の熱 TCA 不溶性画分の count を測定した結果、膜画分に最も高い ^{14}C アミノ酸の蛋白への取込があることが解った。また RNase (5 $\mu\text{g/ml}$) で処理しても膜画分の取込が全く減少しないことは、この取込が膜に結合していないいわゆる cytoplasmic polysome によるものでないこと、更に puromycin 存在下ではどの画分にも取込はみられないことは、 ^{14}C アミノ酸が非特異的に膜画分に吸着したものでないこと、などを示している。一方毒性も膜画分にのみ一致してみられた。

(3) 膜画分における放射能の動態

pulse ラベルした際、膜画分にみられる高い取込はどのような動向を示すかを知るために、1.5分間 pulse ラベルした菌を放射性アミノ酸を含まない培地で培養をつづけて膜画分に於ける取込を調べた。その結果 pulse ラベルした際にみられる取込の約3/4が減少し、ここから遊離したものの約3/4が毒素として菌体外へ遊出していた。なお上清画分には抗毒素で沈降するものは殆んどみられなかった。以上の実験結果は毒素が膜画分で合成され速かに菌体外へ遊出されることを強く示唆している。

(4) 膜附着リボソームの役割及び核酸の解折

毒素の合成部位である膜画分に、強固に附着しているリボソームの毒素合成に際しての役割を知るために、 ^{14}C アミノ酸で pulse 及び pulse and chase して得た膜画分に Na-Deoxycholate を作用させて、蔗糖密度勾配法によって分画し、膜から遊離したりボソームでの取込の変化を観察した。その結果このリボソームへの取込が膜に附着せず存在しているリボソームのそれよりはるかに高く、又これを chase すると膜に附着したりボソームには殆んど取込はみられなかった。毒性も膜に附着したりボソームにみられた。一方 ^{14}C -Uracil を short pulse ラベルした後 actinomycin 存在下で培養を続けると、pulse ラベルした際膜画分にみられた高い取込の大部分が消失していた。更に pulse ラベルした菌の膜画分を phenol によって除蛋白し蔗糖密度勾配法によって分画すると、ポリディスパースの取込の分布を示し、これは RNase によって消失する。このことは膜画分に急速にラベルされ turn over の早い RNA が存在することを示すと共に、膜に附着しているリボソームがポリゾームを形成していることを示唆している。

〔総括〕

毒素を産生しつつある発育抑制培養系に於いて、 ^{14}C アミノ酸を pulse ラベル及び chase し、これ等から得た培養液中のラベルされた毒素を測定して、毒素のアミノ酸から菌体外毒素になるまでの時間を計算すると約3分間であった。一方この時間内でラベルした菌を破壊して分画し、このアミノ酸の各画分の蛋白への取込とその動態を解析した。その結果ジフテリア毒素は膜画分で合成されることが解った。更に膜に附着しているリボソームを遊離させて、 ^{14}C アミノ酸の蛋白への取込と毒性を解析した結果からすれば、この膜に附着したりボソームで毒素蛋白が合成されるものと思われる。

論文の審査結果の要旨

ジフテリア（以下ジと略）菌による毒素産生は、きわめて特徴ある活性蛋白質合成系であって、蛋白の細胞外放出機構、蛋白合成に対する細胞内制御機構さらに溶原変換における形質発現の機構などの解明に通ずる重要な問題である。最近、このジ毒素は生菌によって *de novo* に合成されそのまま菌体外に放出されることが明らかとなり、こゝに毒素蛋白の菌体内での合成機構とくにその合成部位が解明されるべき問題点の一つとなった。さらに最近、本研究室の平井らは、菌発育が極度に抑制されているにかゝらず毒素産生率の変らない新しい培養系を開発した。そこで著者は、この点に注目しジ毒素蛋白の合成部位を明らかにする目的で、放射性アミノ酸の毒素蛋白及び菌体構造画分への取り込みの動態をこの系を用いて詳細に解析し、次のごとき諸知見を得た。

1) ジ毒素の合成速度

¹⁴C アミノ酸でジ菌をパルスラベルおよびそれをチエイイスしたときに産生される放射性毒素の量を計算し、ジ毒素がアミノ酸から合成され菌体外に出現するまでの時間が約3分間であることを明らかにした。

2) 蛋白合成の主要部位としての膜画分

3分間以内でパルスラベルした菌を破壊・分画し、膜、遊離型リボソームおよび上清の各蛋白部分への取り込みを測定した結果、膜画分の放射能比活性が最も高く、一方、遊離型リボソーム画分への取り込みは殆んどないことがわかった。

3) 膜画分におけるジ毒素蛋白の合成

1.5分間パルスラベルした菌をチエイイスし、膜、上清画分および培養液中の毒素蛋白への取り込みを定量し、それらの balance sheet を求めた結果、膜画分の取り込みは、パルス時に比べて約35%減少する一方、この35%が菌体外に産生された毒素蛋白中に検出された。

4) 膜画分での蛋白合成における附着リボソームの役割

パルスラベルおよびチエイイスした菌の膜画分に、デオキシコール酸ソーダを作用させ遊離された附着リボソームへの取り込みの動態を観察した結果、nascent 蛋白が結合しているといわれる 50S の subunit にもっとも取り込みが高く、それは、チエイイスすることによって消失することが明らかとなった。この事実は、附着リボソームが膜画分での蛋白合成に主役を演じていることを強く示唆している。

5) turn over の速い RNase sensitive な RNA の膜画分における存在

¹⁴C ウラシルでパルスラベルした菌をアクチノマイシンの存在下でチエイイスすると、パルスラベルした際、膜画分に見られた高い取り込みは大部分消失した。さらに、このパルスラベルした、膜画分からRNAを抽出し蔗糖密度勾配法で分画すると、リボソームRNAのピークとは一致しないpolydisperseの分布を示し、かつこれはRNaseによって消失した。この事実は、膜画分にいわゆる m-RNA が存在することを示している。

6) 膜画分，遊離型リボソームおよび膜附着リボソームでの毒性の分布

家兎皮内反応で，各画分におけるジ毒性の分布を調べた結果，それは膜画分に一致し，しかも附着リボソームことにその 50S subunit に毒性がみとめられた。

以上の著者の成果は，ジフテリア菌における毒素蛋白質の合成がその膜画分でおこなわれることを明らかにし，かつ，その合成部位が膜附着リボソームである可能性を示唆した点，ジ毒素産生機構の研究に極めて新しい知見を加えたものと考えられる。