



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, 駿
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29114
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	内 田 駿
	うち だ しゆ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1145 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わ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% の庶糖を底に置いた庶糖密度勾配法 10%～30% によって分画した。その結果、膜、リボソーム、及上清の三画分を得た。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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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るものでないこと、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5%が減少し、ここから遊離したもの約3%が毒素として菌体外へ遊出していった。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、庶糖密度勾配法によって分画し、膜から遊離したリ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に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リ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リ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 によって除蛋白し庶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、この膜に附着したリ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わらず毒素産生率の変わ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、次のとおり諸知見を得た。

1) ジ毒素の合成速度

^{14}C アミノ酸でジ菌をパルスラベルおよびそれをチエ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スし、膜、上清画分および培養ろ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2/3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

^{14}C ウラシルでパルスラベルした菌をアツチノマイシンの存在下でチエイスすると、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。