



Title	Staphylococcal enterotoxin産生機構に関する基礎的研究
Author(s)	勝野, 真吾
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30790
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) 勝野

学位の種類 真

薬学

学位記番号 博士

第 2836 号

学位授与の日付 昭和48年3月31日

学位授与の要件 薬学研究科応用薬学専攻

学位規則第5条第1項該当

学位論文題目 **Staphylococcal enterotoxin 產生機構に関する基礎的研究**

論文審査委員

(主査) 教授 近藤 雅臣

(副査) 教授 上原喜八郎 教授 岩田平太郎

教 授 池原 森男

論文内容の要旨

Enterotoxin は *S. aureus* によって菌体外へ産出される耐熱性の蛋白質毒素であり、*S. aureus* によって引き起こされる食中毒の主因物質であるがその毒性の本体、產生機構および產生能の由来などについてはいずれも不明なところが多い。著者は *S. aureus* S6 の產生する Enterotoxin B を対象としてその產生の調節機構、遺伝的性質ならびに他の菌体外蛋白質產生との関係などについて検討を加えた結果、Enterotoxin 產生に関する基礎的な知見を得ることができた。

第1章 Enterotoxin B の定量法

S. aureus S6 における Enterotoxin B 產生機構の解析を行うにあたってまず Enterotoxin B の定量法を確立する必要があった。Enterotoxin B は定量的に取り扱うことのできる生理活性を持たないので、その特異抗血清を調整して免疫法による定量を検討した。

Single diffusion 法では Weirether らの変法を用いたが、この方法は試料の塩濃度および pH によって影響されない良好な定量法であった。

また菌体内の Enterotoxin B の蓄積やその生合成機構を検討するため $L-^{14}C(U)$ -Leucine 取り込みによる Enterotoxin B の新しい定量法を確立した。定量は $L-^{14}C(U)$ -Leucine を含む NZ-Amine 培地で強毒素產生株 *S. aureus* S6 715H を培養して Enterotoxin B を標識にしたのち抗 Enterotoxin B 血清を用いて Enterotoxin B のみを特異的かつ定量的に沈澱させ、沈澱部の放射活性を液体シンチレーション法で測定して行なった。

第2章 環境因子による Enterotoxin B 產生の調節

Enterotoxin B は、自己融解など菌の不可逆的な破壊によって二次的に產生されるのではなく、*S. aureus* S6 の増殖過程で產生され、したがってその產生は菌の生理状態や環境条件に大きく影響される。そこで Enterotoxin B 產生の調節機構を明らかにする目的から、一定量の NZ-Amine 培地

で強毒産生株 *S. aureus* S6 715Hを培養し、増殖にともなう菌の生理状態の変化および環境条件の変化と Enterotoxin B 産生との関係を調べた。

Enterotoxin B は対数増殖期初期には産生されず、対数増殖期後期から定常期初期にかけて特異的に産生された。また、さらに培養を続けても、定常期中期以後 Enterotoxin B 産生量は増加しなかった。この条件下では産生された Enterotoxin B の98%以上が菌体外に存在し、Enterotoxin B は合成されると速かに菌体外へ放出されると考えられた。非増殖系を利用して培養齢と Enterotoxin B 産生の関係を調べると培養齢の高い菌体ほど Enterotoxin B 産生量が多く、この結果から Enterotoxin B の産生は培養齢にともなう菌体内の生理状態の変化と密接に関連して調節されると考えられた。一方、定常期中期の培養液の pH を中性ないし弱酸性に調節してさらに培養を続けると Enterotoxin B が新たに産生されることが見い出された。この pH 調整処理は生菌数に影響を与えないで新しい Enterotoxin B の産生は個々の菌の持つ Enterotoxin B 産生能力にもとづくものと考えられた。この Enterotoxin B の産生は pH 調整後ただちに認められ、すべて菌体外から取り込まれたアミノ酸に依存する *de novo* の Enterotoxin B 蛋白質の合成にもとづくことが明らかとなった。また、Chloramphenicol のみならず Actinomycin D によっても抑制されるので Enterotoxin B 構造遺伝子の転写過程 (mRNA 合成) を経ると考えられた。これらの結果から増殖系では菌の Enterotoxin B 産生能力は培養齢にともなって増加するが、増殖の結果、培養液の pH がアルカリ性に変化すると菌体外からのアミノ酸の取り込みが抑えられるためにその発現が抑制されると推測された。pH 調整処理はこの抑制を除去し、新しい Enterotoxin B の産生を引き起こすと考えられた。

第3章 Enterotoxin B 産生能を異にする *S. aureus* S6 の変異株の分離とその性質の比較

S. aureus S6 の Enterotoxin B 産生能の由来、その性質を明らかにする目的から *S. aureus* S6 より Enterotoxin B 産生能を異にする自然突然変異株を分離し、その Enterotoxin B 産生能の相違の原因および Enterotoxin B 産生と他の生理活性との関係などについて検討を加えた。

抗 Enterotoxin B 血清を含む NZ-Amine 寒天培地を用いて *S. aureus* S6 より Enterotoxin B 産生能の異なる自然突然変異株を分離することができた。強毒産生株 *S. aureus* S6 715Hは、NZ-Amine 培地で16時間振とう培養すると、その培養上清中に 370 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Enterotoxin B を産生した。これに対し弱毒産生株 *S. aureus* S6 715NH は同条件下で 22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Enterotoxin B を産生した。しかし、増殖に関する基本的な生理活性と考えられる菌体蛋白質合成およびアンモニア産生の両活性は、両変異株の間に有意差がなかった。また同様の方法で分離した他の変異株においてもその基本的な生理活性に差はなかった。したがって、Enterotoxin B 産生は *S. aureus* S6 の増殖に必須な性質ではないと推測された。

S. aureus S6 715H、*S. aureus* S6 715NH 両変異株の産生する Enterotoxin B 蛋白質は、免疫的およびディスク電気泳動的にまったく同一であり、また両変異株は Enterotoxin B を分解するような Protease を産生しなかった。さらに両変異株の Enterotoxin B 分泌過程にも差異は認められなかった。これらの結果から両変異株は、Enterotoxin B 蛋白質の *de novo* 合成過程に遺伝的な相違を持つと推測された。分離された自然突然変異株の Enterotoxin B 産生能は安定であったが強毒産生株のうち 1 株のみは保存中に弱毒産生株に変換した。

第4章 Enterotoxin B 産生と他の菌体外蛋白質産生の関係

一般に、*S. aureus* はその病原性の原因となる多くの毒素あるいは酵素を菌体外に産生するが、これらのうち数種はしばしばたがいに共存して産生される。この現象は *S. aureus* の病原性の由来とその実体を知るうえで重要な問題を含むと考えられる。Enterotoxin B 産生能を異にする *S. aureus* S6 の自然突然変異株を分離し、その性質を比較した結果、Enterotoxin B 産生量と菌体外総蛋白質産生量との間に明らかな相関性が認められたので、両者の関係について検討した。

強毒素産生株 *S. aureus* S6 715H と弱毒素産生株 *S. aureus* S6 715NH の産生する菌体外蛋白質をディスク電気泳動によって分析すると *S. aureus* S6 715H は12種類、*S. aureus* S6 715NH は8種類の菌体外蛋白質を産生し、その個々の蛋白質産生量はいずれも *S. aureus* S6 715H の方が *S. aureus* S6 715NH より高かった。また、*S. aureus* S6 が産生する菌体外毒素および酵素の活性について両変異株を比較すると、活性を示した6種類のうち5種類、すなわち α -Hemolysin、 δ -Hemolysin、Alkaline phosphatase、Ribonuclease および Staphylokinase (Fibrinolysin) 活性において *S. aureus* S6 715H は *S. aureus* S6 715NH より高い値を示した。一方、Enterotoxin B と菌体外蛋白質全体の mRNA の寿命はほぼ等しかった。

これらの結果は、Enterotoxin B を含めて少なくとも上記の6種類の毒素あるいは酵素の産生が同一の機構で調節されていることを示唆した。Enterotoxin B 産生能は plasmid に由来すると報告されているので、この調節機構を説明するものとして Enterotoxin B を含めた6種類の毒素あるいは酵素の構造遺伝子が同一の Plasmid 上に存在する可能性が考えられた。

Enterotoxin B および菌体外蛋白質全体の mRNA は40分から60分の寿命を持ち、菌体蛋白質の mRNA にくらべて著しく安定であることが明らかになった。この結果は菌体外蛋白質 (Enterotoxin B を含めて) の mRNA が何らかの機構で安定化されていることを示唆した。

〔結論〕

S. aureus S6 の産生する Enterotoxin B を対象として Enterotoxin 産生機構に基礎的な検討を加えた結果、以下の事を明らかにした。

- (1) *S. aureus* S6 による Enterotoxin B の産生は、de novo の蛋白質合成にもとづくものであり またその遺伝形質は *S. aureus* S6 の増殖に必須のものではないことが明らかとなった。
- (2) *S. aureus* S6 による Enterotoxin B の産生は増殖にともなう菌体内的生理状態の変化と密接に関連して調節され、また外的環境の変化、ことに pH の変化によっても調節されることが明らかとなった。pH による Enterotoxin B 産生の調節は、アミノ酸の取り込みを介して行なわれる、 Enterotoxin B 構造遺伝子の読み取り (mRNA 合成) の調節にもとづくと推測された。
- (3) *S. aureus* S6 の産生する菌体外蛋白質 (Enterotoxin B を含めて) の mRNA は菌体蛋白質の mRNA にくらべて著しく安定であり、約40分から60分の寿命を持つことが明らかとなった。
- (4) *S. aureus* S6 においては、その産生する菌体外毒素あるいは酵素のうち少くとも 6 種類、すなわち Enterotoxin B、 α -Hemolysin、 δ -Hemolysin、Alkaline phosphatase、Ribonuclease および Staphylokinase (Fibrinolysin) の産生が、同一の遺伝的調節機構下にあり、それらの構造遺伝子は、同一の Plasmid 上に存在する可能性が考えられた。

論文の審査結果の要旨

Staphylococcus aureus S6 の産生する Enterotoxin B の産生は de novo の蛋白質合成にもとづくこと、その遺伝形質は本菌の増殖に必須のものではないこと、この toxin の産生は、菌体内の生理状態の変化と密接に関連して調節されると同時に、外的環境の変化、とくに pH の変化によっても調節されること、toxin をふくむ菌体外蛋白質 mRNA は菌体蛋白質の mRNA にくらべ著しく安定であることなどを明らかにしたもので、薬学博士の学位を授与するに値する論文である。