



Title	ジフテリア毒素産生機構に関する研究
Author(s)	金井, 知恵
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31899">https://hdl.handle.net/11094/31899</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	かな い ち え 金 井 知 恵
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 4 0 4 3 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 8 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	ジフテリア毒素産生機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 近藤 雅臣 (副査) 教 授 青沼 繁 教 授 上原喜八郎 教 授 岩田平太郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

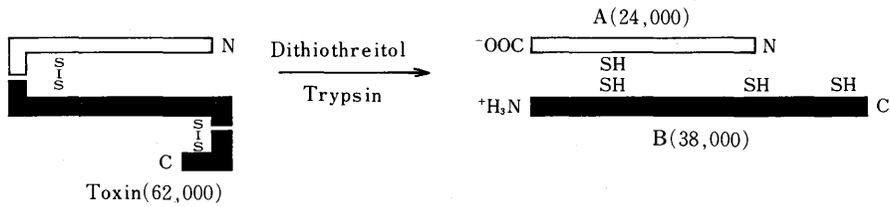
### 緒 論

ジフテリア毒素は、ジフテリア菌によって菌体外に産生される分子量約62,000の単純蛋白質である。ジフテリア菌は毒素産生と溶原性の関係が早くに見いだされた菌として<sup>1)</sup>、また、その毒素産生が微量の鉄の存在によって特異的に阻害される<sup>2)</sup> 特徴ある蛋白生成系の一つとして、古くから極めて興味ある研究対象とされてきた。近年、ジフテリア毒素そのものの構造と機能に関してはめざましい研究成果があげられ、その全貌が明らかにされつつあるが、産生機構に関しては遺伝学的な手法を用いることの困難さから未だ未解明な部分が多く残されている。鉄による毒素産阻害の機構を解明することは、ジフテリア毒素産生機構の全貌を明らかにする手がかりが得られるものと考えられる。このような観点から、溶原性毒素産生株C7( $\beta$ )を用い、毒素産生における鉄の特異的阻害機構を明らかにすることを試みた。

### 本 論

#### (1) ジフテリア毒素フラグメント産生菌の分離、性状およびその産生における鉄の影響

ジフテリア毒素は分子量約62,000の single polypeptide chain よりなり、2個のS-S結合をもっている。Trypsinで mild に消化し、Dithiothreitol の存在下で S-S結合を還元開裂すると、図1のように分子量約24,000の Fragment A と分子量約38,000の Fragment B に解離する。Fragment A は毒素のN末端側に位置していて、ジフテリア毒素のもつ酵素活性(ADP-ribosylating 活性)を有している。Fragment B は酵素活性をもたず、細胞への結合と Fragment A を細胞内へ送りこむのに必要な部分であることが明らかにされている。そのため Fragment A または Fragment B は各々単独では



ジフテリア毒素のトリプシンと還元剤処理前後の形



上記の反応を毒素は触媒する

図1 ジフテリア毒素蛋白の構造と機能

毒性はない<sup>3)</sup>

そこでまず、鉄によってどの程度まで小さな毒素蛋白フラグメントの産生が阻害されるのかを検討した。

C7( $\beta$ )をAdelbergらの方法<sup>4)</sup>により、ニトロソグアニジン処理し、 $\beta$ ファージのもつ毒素の構造遺伝子に変異をおこした変異株C7( $\beta$ -NG2)を得た。このC7( $\beta$ -NG2)の産生蛋白は分子量約24,000で毒性は全くなく、ADP-ribosylating活性や、抗原性からもFragment Aにほぼ近いものであることが明らかとなった。C7( $\beta$ -NG2)における毒素フラグメントの産生は、鉄およびクロラムフェニコールの添加によりそれぞれ阻害された。この結果は分子量24,000の毒素蛋白フラグメントがde novoに合成されること、また合成されて分泌されてくる途上のいずれかの過程を鉄が阻害していることを明らかにした。

#### (2) 鉄による毒素産生阻害のみられない変異菌の分離、性状およびその変異の解析

鉄による毒素産生阻害機構を明らかにするためには、産生阻害が宿主側、あるいは毒素蛋白の構造遺伝子をもつファージ側のいずれに起因するかを検討することもまた必要である。そこで鉄による毒素産生阻害のみられない変異株を分離し、それらと親株との比較解析を試みた。

変異株の分離は(1)と同様、C7( $\beta$ )をニトロソグアニジン処理し、過剰鉄および馬抗毒素血清を含む寒天平板培地を利用してコロニーのまわりに毒素抗毒素の特異沈降帯を形成したものを選択分離した。約4万個のコロニーより5株(hm722, hm723, hm726, hm728, hm729)分離した。液体培地での毒素産生を調べた結果表1のように5株は過剰鉄(3  $\mu\text{g/ml}$ )存在下でも、親株のC7( $\beta$ )とは違って、毒素を産生した。これら変異菌5株の菌体吸着鉄は、培地中の鉄量の増加と共に増加し、その傾向は親株と変わらなかった。親株と増殖速度のかわらなかつた変異菌hm723においては、分子量、毒性、抗原性からみて、鉄欠乏時に産生される毒素と過剰時に産生される毒素の間には違いはなかつた。そこで、これらの変異菌における鉄の毒素産生阻害効果の変化が $\beta$ ファージ側によるものか、それとも宿主側菌

表1. Effect of Iron on Toxin Production of C7( $\beta$ ) and of Mutants.

a. Modified Linggood's Medium

Strain	Iron added 0.1Mg/ml		Iron added 3Mg/ml	
	Toxin Yield (Lf/ml)	Final Growth(OD)	Toxin Yield (Lf/ml)	Final Growth(OD)
c7( $\beta$ )	20	15.3	ND	15.0
hm722	20-25	11.4	25	13.5
hm723	20-25	13.2	20-25	15.0
hm726	15-20	8.6	5-10	9.9
hm728	20-25	11.7	25-30	15.6
hm729	20	12.9	10-15	10.8

b. PGT Medium

Strain	Iron added 0.1Mg/ml		Iron added 2Mg/ml	
	Toxin Yield (Lf/ml)	Final Growth(OD)	Toxin Yield (Lf/ml)	Final Growth(OD)
c7( $\beta$ )	4	5.7	ND	6.0
hm722	4	5.7	4	6.0
hm723	4	5.1	4	5.7
hm726	4	3.2	2	3.2
hm728	4	6.3	4	6.0

側の変異によるのかを、変異菌からの prophage のない非溶原性株の分離、解析などから検討し、変異が宿主菌側におこっていることを証明した。

(3) C7( $\beta$ )のL-phaseの分離、性状およびその毒素産生における鉄の影響

C7( $\beta$ )をL-phase induction medium(Brain heart infusion (BHI)を基礎培地としてNaCl3%, G Glycine 1.25%, 寒天1%, それに10%馬血清を加えたもの)に塗布し、ペニシリンディスクを用いて誘導を行なった。誘導されたL-phaseコロニーは明るい透明な感じのする周辺部と暗い中心部とからなる典型的なfried-egg状を呈していた。薬剤感受性テストの結果は細胞壁合成阻害剤に対しては全く耐性であった。またbacterial phaseとは違いポリミキシンBに感受性を示した。液体培養後、Filterabilityを検討した結果、最小増殖単位はbacterial phaseと異なり0.45  $\mu$ 以下であることが明らかとなった。細胞壁のないL-phaseによる毒素蛋白の産生は、親株のbacterial phaseと同様に培地過剰鉄により阻害されることが明らかとなった。このことは鉄によるジフテリア毒素産生阻害には、細胞壁が関与していないことを強く示唆している。

結 論

1. 分子量24,000の毒素蛋白フラグメント (ragment Aに近似する)の産生は、培地中の過剰鉄により阻害された。
2. C7( $\beta$ )より鉄による毒素産生阻害のみられない変異株を5株分離した。解析の結果、その変異はいずれも宿主側に起因するものであった。
3. C7( $\beta$ )より細胞壁がなくても増殖可能なL-phaseを分離した。L-phaseによる毒素産生は鉄により阻害された。

## 文 献

1. Freeman, V. J.; J. Bacteriol., 61 675 (1951)
2. Locke, A. and E. R. Main; J. Infec. Dis., 48 419 (1931)  
Pope, C. G.; Brit. J. Exp. Pathol., 13 218 (1932)  
Pappenheimer, A. M. Jr. and S. J. Jhonson; Brit. J. Exp. Pathol., 28 354 (1936)
3. 内田 麿; 生化学, 46 (4) 165 (1974)
4. Adelberg, E. A., M. Mandel and G. C. C. Chen Biochem. Biophys. Res. Commun., 18 788 (1965)
5. 江田亨, 松岡俊介, 田所一郎; 日本細菌学雑誌, 27 657 (1972)

## 論文の審査結果の要旨

ジフテリア毒素産生機構を明らかにする目的で、鉄による毒素産生阻害現象をとり上げ、この阻害が毒素たん白フラグメントの産生阻害によりおこり、しかも、宿主側に起因するものであって、毒素たん白の構造遺伝子をもつファーージ側に起るものではないことを証明した。また、これまで得ることができなかったジフテリア菌のL-phaseを分離し、鉄による毒素産生阻害には細胞壁は関与していないことを明らかにした。これらの研究成果は学位請求論文として価値あるものと認める。