

Title	コレラ毒素のAサブユニットから得られるAdenylate cyclase活性化能をもつ低分子フラグメント
Author(s)	松尾, 雄志
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32947
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	松 尾 雄 志
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 1 6 7 号
学位授与の日付	昭和 56 年 2 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	コレラ毒素のAサブユニットから得られる Adenylate cyclase 活性化能をもつ低分子フラグメント
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉
	(副査) 教授 山野 俊雄 教授 濱岡 利之

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

Vibrio cholerae が産生するコレラ毒素の生理作用はadenylate cyclase (A-cyclaseと略す)を活性化し、細胞内のcAMP濃度を高めることによって発現される。コレラ毒素はコレラ症の主要な発現場所である腸管以外に、種々の細胞に取り込まれ、細胞膜の内側に局在するA-cyclaseを活性化する。

コレラ毒素は分子量約84,000の蛋白質であり、1個のAサブユニット(分子量約22,000のA₁サブユニットと約6,000のA₂サブユニットのS-S結合体)と5個のBサブユニット(分子量約12,000)から成る。細胞膜を用いたin vitro実験によって、A₁サブユニットがA-cyclase活性化の本体であり、その活性化にはNADが必須であることが明らかにされている。しかし、細胞内に取り込まれたコレラ毒素が細胞内において受ける変化あるいは修飾については不明な点が多い。

著者は、コレラ毒素がA-cyclaseを活性化するに際して、細胞内に取り込まれた後に細胞膜の内側に局在するA-cyclaseに作用することに着目し、コレラ毒素が細胞内でどのような変化あるいは修飾を受けるかを明らかにする目的で、sarcoma 180細胞の膜顆粒画分を用いて本研究を行なった。

[方法ならびに成績]

I プロテアーゼ活性に依存したコレラ毒素の低分子化

コレラ毒素をsarcoma 180細胞の膜顆粒画分と反応させ、遠心分離後、得られる上清をSephadex G-100カラムで分離した。各画分のA-cyclase活性化能を膜顆粒画分を用いて調べた結果、

i) 未処置のコレラ毒素中に、A₁サブユニットよりも低分子でA-cyclase活性化能をもつフラグ

メントが少量存在する。ii) このフラグメントの生成はコレラ毒素を膜顆粒画分と30℃, pH 7.4で40~60分間反応させるときに, 最大であり, iii) プロテアーゼ阻害剤の添加によって完全に抑制されることが明らかとなった。

II A₁ およびAサブユニットからの低分子フラグメントの生成

A₁サブユニットを膜顆粒画分と反応させ, 遠心分離して得られる上清を sodium dodecyl sulfate (SDS) と dithiothreitol (DTT) の共存下に Sephadex G-100 で分析した。その結果, A-cyclase 活性化能をもつ低分子フラグメント (分子量約10,000以下) が生成され, これに反して, 未処置のA₁ サブユニットの分子サイズは SDS 共存下の分子篩クロマトグラフィで変化しなかった。同様に, formic acid 存在下でコレラ毒素から Sephadex G-75 カラムで調製した A サブユニットからも低分子フラグメントが得られた。上記の生成反応はプロテアーゼ阻害剤の添加によってほぼ完全に阻害された。

III ショ糖密度勾配遠心分離における低分子フラグメントの挙動

A-cyclase 活性化能をもち分子量最小のフラグメントは SDS の非存在下において会合体を形成しやすいが, SDS 共存下では cytochrome c (12,500) よりも遅く沈降した。A および A₁ サブユニットも会合性をもつが, SDS 共存下でも cytochrome c よりも早く沈降した。

IV 低分子フラグメントの抗原性と安定性

低分子フラグメントの A-cyclase 活性化能はコレラ毒素の抗体によって阻害されたが, B サブユニットの抗体によっては全く影響を受けなかった。低分子フラグメントの A-cyclase 活性化能は 90℃, pH 7 で 5 分間の熱処理に対して安定であった。

[総括]

1. コレラ毒素 (分子量 約84,000) を sarcoma 180細胞の膜顆粒画分と反応させると, A-cyclase 活性化能を有する種々の分子サイズのフラグメント (ペプチド断片) が生成された。
2. フラグメントの主要成分は約 8,000~10,000 の分子量をもち, 最小有効フラグメントの分子量は約 1,400 であった。
3. 低分子フラグメントはコレラ毒素, A あるいは A₁ サブユニットから膜顆粒画分中のプロテアーゼによって生成された。この生成反応は 30℃, pH 7, 40~60分 で最大を示し, プロテアーゼ阻害剤によって著しく阻害された。
4. 低分子フラグメントの A-cyclase 活性化能はコレラ毒素の抗体によって阻止されたが, B サブユニットの抗体によっては影響されなかった。
5. 低分子フラグメントによる A-cyclase 活性化能には NAD が必須であり, その活性化能は 90℃, pH 7 で 5 分間の熱処理に対して安定であった。

論文の審査結果の要旨

本研究はコレラ毒素による Adenylate cyclase の活性化について、コレラ毒素の A₁ サブユニットが細胞内プロテアーゼによって低分子化されて作用することを明らかにした。この低分子フラグメントはペプチドホルモンによる Adenylate cyclase 活性化機構の研究に役立つものである。