OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンのサブユニットとコレラエンテロトキシンのサブユニットからの活性毒素の試験管内形成について
Author(s)	多賀, 関子
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33119
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【33】

氏名・(本籍)	多賀関子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第5467号
学位授与の日付	昭和56年12月1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	毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンのサブユニットとコレラエンテロトキシンのサブユニットからの活性毒素の試験管内形成について
論文審査委員	(主査) 教授 三輪谷俊夫 (副査) 教授 井上公蔵　教授 松田守弘

論文内容の要旨

〔目　的〕

近年，小児下痢，旅行者下痢の原因菌として重要視されている毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシン（LT）は，コレラエンテロトキシン（CT）と物理化学的性状，生物学的性状が類似し，免疫学的にも両毒素は部分的に共通の抗原を有することが知られている。Clements and FinkelsteinはLTがBio Gel A-5mに特異的に吸着する性質を利用し，高純度のLTの精製標品を得ることに成功し，精製されたLTはCTのAおよびBサブユニットに相当する2つのサブユニットから構成されていることを報告した。

本研究では，ヒト由来LT産生株から，Clements and Finkelsteinの方法に準じ，一部改変してLTを精製し，精製LTからAサブユニット（LTA）およびBサブユニット（LTB）を単離し，単離したサブユニットから毒素分子の再構成を試みた。また，CTから単離したサブユニット（CTA, CTB）との間で，LTAとCTB, CTAとLTBの組み合わせで生物活性のあるハイブリッド毒素が試験管内で形成されるかどうかを調べることを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

1）大阪空港検疫所において旅行者下痢患者から分離した毒素原性大腸菌536-5（LT産生株）を用いた。培養には，リンコマイシン90μg/mlを添加したCAYE培地を用い，37℃24時間振盪培養を行った。培養上清を遠心し，菌体を集め，0.9%食塩加1/100Mトリス塩酸緩衝液pH 8.6に懸濁し，超音波処理をした。遠心後上清を65%飽和硫安で塩析し，TEAN緩衝液（50mMトリス塩酸pH 7.4, 1 mM EDTA-2Na, 3mM NaN_3, 200mM NaCl）で透析後，Bio Gel A-5mのカラムに吸着させ

た。TEAN緩衝液で十分に洗ったのち，ガラクトースでＬＴを溶出した。溶出の各画分を抗ＣＴ血清に対するゲル内沈降反応で調べると，TEAN緩衝液で溶出されてくる部分にはＬＴが認められず，ガラクトース溶出部にのみ沈降線が確認された。この部分を濃縮し，さらにSephacryl S-200 ゲルろ過を行い，抗ＣＴ血清反応部分を集め，純度をPAGEで調べた。同時に泳動した２本のゲルのうち１本を染色し，他の１本を2㎜間隔で切り出し，少量のTEAN緩衝液で抽出し，チャイニーズハムスターオバリー細胞の形態変化を調べる方法でＬＴの活性部位を調べると，単一の染色バンドの位置に一致して活性が認められた。

2）得られた精製ＬＴを尿素，プロピオン酸溶液（６Ｍ尿素，0.1Mプロピオン酸）に対して透析処理後尿素-プロピオン酸溶液で平衡化したSephadex G-75カラムでゲルろ過を行うことにより，LTA, LTBを単離した。単離したLTA, LTBの純度はSDS-PAGEにより確認した。

3）LTAおよびLTBの画分を等量混合して，TEAN緩衝液に対して透析した標品をPAGEで調べると，精製ＬＴに一致する位置に泳動する蛋白バンドが検出された。またこの標品は，精製ＬＴと同程度の生物活性を持つことがわかった。これらの結果から，Ａ，Ｂサブユニットから活性のある毒素分子が再構成されたと結論した。ＣＴについても同じ様に，Ａ，Ｂ両サブユニットから毒素分子の再構成に成功した。再構成毒素の生物活性も，精製ＣＴと同程度であった。

4）CTAとLTB, LTAとCTBの組み合わせで３）と同様の透析を行い，ハイブリッド毒素が形成されているかどうか調べた。PAGEで泳動すると，透析処理標品は，LTA, LTB, CTA, CTB, 精製ＣＴ，精製ＬＴのいずれにも一致しない位置に新たな蛋白バンドが検出された。CTAとLTB, LTAとCTBから構成された標品のバンドは，ＣＴとＬＴの泳動位置の中間に位置し，ハイブリッド毒素が構成されたと考えた。そこで生物活性を調べたところ，CTAとLTBのハイブリッド毒素は精製ＣＴにほぼ等しい活性を有しており，LTAとCTBのハイブリッド毒素は，精製ＬＴに等しい活性を示した。これらの成績から，活性のあるハイブリッド毒素が試験管内で形成され，ハイブリッド毒素の活性の強さはＡサブユニットの活性の強さに依存していることがわかった。

〔総　　括〕

1）ヒト由来毒素原性大腸菌からＬＴを精製し，Ａ，Ｂサブユニットに分離した。分離したサブユニットから毒素活性を持つＬＴを再構成した。

2）ＬＴおよびＣＴのサブユニットを，LTAとCTB，CTAとLTBの組み合わせで混合し，活性のあるハイブリッド毒素を得た。

3）CTAとLTBから形成したハイブリッド毒素の活性の強さはＣＴの活性の強さにほぼ等しく，LTAとCTBから形成したハイブリッド毒素の活性の強さはＬＴの活性の強さにほぼ等しい。このことは，毒素活性の強さはＡサブユニットが担っていることを示唆している。

論文の審査結果の要旨

今日まで，多くの研究者により毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシン(LT)とコレラエンテロトキシン（CT）の生物学的性状と免疫学的性状の類似性が報告されている。本研究ではLTのサブユニットとCTのサブユニットから，毒素活性をもつハイブリッド毒素の形成に成功した。このことは，両毒素のサブユニットの立体構造もきわめて類似していることの証明である。また，ハイブリッド毒素間の活性の差から，活性がAサブユニットによって担われていることを確認した。これらの成績は両毒素の性状について重要な情報を提供するもので学位論文として価値あるものである。