

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、 〈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)	多 賀 関 子
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 4 6 7 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 $90\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した CAYE 培地を用い、 37°C 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% 飽和硫酸で塩析し、TEAN 緩衝液 (50 mM トリス塩酸 pH 7.4, 1 mM EDTA-2Na, 3 mM NaN_3 , 200 mM 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2mm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。