



Title	精製Shiga toxinの物理化学的、生物学的性状について
Author(s)	湯通堂, 隆
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34657">https://hdl.handle.net/11094/34657</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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)	ゆ つ どう 湯 通 堂	たかし 隆
学位の種類	医 学 博 士	
学位記番号	第 6831	号
学位授与の日付	昭和 60 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻	
	学位規則第 5 条第 1 項該当	
学位論文題目	精製 Shiga toxin の物理化学的、生物学的性状について	
論文審査委員	(主査) 教 授 三輪谷俊夫	
	(副査) 教 授 井上 公藏 教 授 松田 守弘	

## 論 文 内 容 の 要 旨

## (目 的)

志賀赤痢菌の產生する Shiga toxin は実験動物に投与すると四肢に痙攣や麻痺を起こして動物を致死させる蛋白質であり、古くから神経毒として知られていた。われわれをはじめいくつかの研究グループが Shiga toxin の精製と作用について報告しているが、毒素の構造と機能を解析するためには従来の毒素の精製法では収率が悪く、純度の点でも問題が残されていた。本研究ではクロマトフォーカシングによる等電点分画を加えることにより Shiga toxin を高回収率、高純度で精製することができたので、精製毒素の物理化学的性状と生物学的性状について調べた。

## (方法ならびに成績)

1) 使用菌株：Bangladesh で患者の下痢便から分離した Shigella dysenteriae 1 RI MD 3101010 株を用いた。

2) 毒素の精製：マウスの致死を指標として Shiga toxin を精製した。Modified Syncase Medium で 37°C, 48 時間振とう培養後の培養上清を限外ろ過によって濃縮し、硫酸分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの後、クロマトフォーカシングを 2 回行なった。精製毒素はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で単一のバンドとして泳動し、その位置と一致してマウスに対する致死活性が観察できた。15 l の培養上清から 1.6 mg の高純度精製毒素を得、最終標品の活性回収率は 27% であった。

3) 生物活性の測定：4 週令の ddY 系雄マウスに検体を 0.5 ml 腹腔内投与し、1 週間観察して致死活性を調べてみると、精製毒素の LD<sub>50</sub> は 28 ng であった。Vero 細胞に対する細胞毒性試験では CD<sub>50</sub>

は 1 pg であった。ウサギ結紮腸管ループ法により腸管毒性を調べてみると、精製毒素 1  $\mu$ g 以上で液体貯留を観察した。

4) 精製毒素の物理化学的性状: 精製 Shiga toxin は易熱性の単純蛋白質でポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動により pI は 7.0 であった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、Shiga toxin は A, B 2 つのサブユニットから構成されていることがわかった。分子量標準蛋白質からホロ毒素の分子量は 62,000, A サブユニットは 30,000, B サブユニットは 5,000 ~ 6,000 と推定した。この結果から Shiga toxin は 1 つの A サブユニットと 5 つの B サブユニットから構成されていると考えられた。A サブユニットはトリプシン処理後 DTT 存在下で SDS-PAGE を行なうと分子量が約 27,000 に変化した。このことから Shiga toxin はコレラ毒素 (CT) や毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシン (LT) と同じように A, B サブユニットから成り、A サブユニットはトリプシン処理後 S-S 結合を還元すると  $A_1, A_2$  フラグメントに解離することがわかった。

5) サブユニットの分離精製と A および B サブユニットからの活性毒素の再構成: 尿素-プロピオン酸溶液で前処理した精製 Shiga toxin を同溶液を溶媒として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるゲルろ過を行なった。2 つのピークが得られ、各ピークの SDS-PAGE の泳動位置は ホロ毒素を泳動したときの A, B 各サブユニットにそれぞれ一致した。次に、HPLC で単離した A, B サブユニットから毒素の再構成を試みた。すなわち、尿素-プロピオン酸溶液に溶けている A, B 各サブユニットを混和し、透析膜に入れトリス塩酸緩衝液で透析した。透析内液をポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動で分析するとホロ毒素 (native toxin) と同じ位置に染色バンドが現われた。また、A, B 各サブユニット単独では 1  $\mu$ g 以上でもマウスの致死は観察できなかったのに対し、透析内液、すなわち再構成した毒素の LD<sub>50</sub> は 62 ng であり、生物活性を有する毒素が再構成できたことがわかった。

#### (総括)

- 1) マウスの致死を指標として培養上清から Shiga toxin を高回収率、高純度で精製した。
- 2) 精製毒素はマウス致死活性のほか、Vero 細胞に対する細胞致死毒性や腸管毒性も示すことを明らかにした。
- 3) Shiga toxin は易熱性の蛋白質で等電点は 7.0 であり、A ( $A_1 + A_2$ ), B 2 つのサブユニットから構成されていることがわかった。
- 4) HPLC により Shiga toxin の 2 つのサブユニットが単離でき、単離したサブユニットから活性毒素を再構成することができた。

#### 論文の審査結果の要旨

疫痢患者にみられた脳中毒症状の重要な原因毒素と考えられる Shiga toxin について今までにいくつかの研究グループがその精製と作用について報告しているが、従来の方法では回収率が悪く、純度の点でも問題が残されていた。本論文はクロマトフォーカシングによる等電点分画法を導入することによっ

て Shiga toxin を高回収率、高純度で精製することに成功し、Shiga toxin の物理化学的、生物学的性状を明らかにしたものである。本研究は、今後 Shiga toxin の作用機構を詳しく分子レベルで解析するために大きく功献するものである。