

Title	培養細胞を用いたA型ウェルシュ菌エンテロトキシン作用機序の解析
Author(s)	杉本, 央
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/35077
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	すぎ 杉	もと 本	なかば 央
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	6920	号
学位授与の日付	昭和60年5月8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	培養細胞を用いたA型ウェルシュ菌エンテロトキシン作用機序の解析		
論文審査委員	(主査)		
	教授	松田 守弘	
	(副査)		
	教授	井上 公蔵	教授 三輪谷俊夫

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

A型ウェルシュ菌が芽胞形成に伴って産生するエンテロトキシン(以下ENTXと略記)は、分子量約3万5千の単純蛋白である。その作用は、これまで主として動物レベルで研究され、腸管での水や電解質代謝の変化、組織の障害、毛細血管透過性の変化、脳幹の呼吸中枢に作用して呼吸停止、をおこすことが報告されている。しかし細胞レベル、分子レベルでの作用機序は明らかではない。また、従来のENTXの産生および、精製方法は再現性が少なく、かつ高度に精製された標品を得ることが困難であった。

本研究では、ENTXを再現性良く高度に精製する方法を確立し、高度精製ENTX標品を用いて、その作用を細胞レベルで解析した。

(方法ならびに成績)

1. ウサギ抗ENTX血清添加Duncan-Strong培地寒天平板を用いた高度毒素産生株の分離

ENTX産生株 *C. perfringens* type A NCTC 8239 をウサギ抗ENTX血清を含む(4 μg ENTX Equivalent/ml) Duncan-Strong培地(以下DS培地と略記)寒天平板上に播き、嫌気性条件下に集落を形成させた。周囲に毒素-抗毒素沈降輪を形成した集落から得た菌株は、沈降輪非形成集落の株よりも多量のENTXをDS液体培地中で再現性よく産生した。

2. 高速液体クロマトグラフィーによるENTXの高度精製

上述の方法で分離した高度毒素産生株をDS液体培地で37℃、8時間培養し、菌体から得た超音波抽出液の40%飽和硫酸沈澱画分を2回抽出し、毒素を多く含む第2回目の抽出液を、G2000SWカラム(東

洋曹達)による高速ゲル濾過を行った。得られた毒素標品は、ポリアクリルアミド電気泳動法で、従来の方法で得た精製標品と同等の均一性を示した。しかし、この標品はMono Qカラム(ファルマシア)によるイオン交換高速液体クロマトグラフィーで、毒素の主ピークと、他の少なくとも6つの非毒素の小ピークに分かれたので、同カラムを用いることによって、より高度に精製された毒素標品を得ることができ、以下の作用機序解析に用いた。

3. ENTXの細胞致死作用発現のための必須因子の解析

ENTXによる細胞致死作用発現には細胞外液にCaが必須であることを見出した。HeLaあるいはVero細胞にイーグル培地中で100 ng/ml以上の毒素濃度でENTXを作用させると15~20分後にまず細胞表面にblebが生じ、次に細胞は球状に膨み、やがてトリパンプルー排除試験で細胞死を認めた。この変化はCa, Mgを含むリン酸緩衝生理食塩水(以下CaMg-PBSと略記)中でも同様に認められた。しかしCaを含まないリン酸緩衝液(Mgは含む、以下Mg-PBSと略記)中ではENTXを作用させても細胞のこのような形態変化は現れなかった。

4. ENTXの細胞毒作用発現過程の諸段階-細胞外Ca非依存性段階とCa依存性段階

Mg-PBS中でENTXを37°C, 20分間作用させた後、遊離のENTXを洗浄によって除き、外液をCaMg-PBSにおき替えるとただちに細胞にbleb形成がおこった。このことは、ENTXによるbleb形成に到る細胞致死過程は細胞外液にCaがない条件でもbleb形成がおこる直前の段階まで進んでいることを示している。すなわちENTXの細胞毒作用発現過程はCa非依存性の初段階と、bleb形成に到るCa依存性の後期段階の2つに分けられることが解った。

5. ENTXによるCaの細胞内流入

ENTXの細胞致死作用発現においてCaが細胞内へ流入しているかについて次に検討した。CaイオンフォアA23187で細胞を処理すると、ENTXを作用させたときと同様のbleb形成が見られた。そこで細胞内Ca量を原子吸光分光光度計を用いて測定したところ、ENTX処理をした細胞のCa量は対照の非処理細胞の約3倍に増加していた。細胞内Ca量の増加は毒素用量に依存し、毒素処理後約10分後からすでに増加が認められた。ENTXによるCaの細胞内流入の様相を明らかにするために、ENTXの細胞内Mg, Na, K量に対する影響を調べた。細胞内Mg, Na, Kの量はいずれもが細胞をENTX処理すると変化し、その変化の方向は、これらのイオンの細胞内外の生理的な濃度勾配が失われる方向であった。以上の結果から、ENTXは細胞に結合した後、細胞膜の透過性の変化を惹きおこして細胞内へ多量のCaを流入させ細胞内Ca濃度を高め、それによってbleb形成をおこし、細胞を致死させると考えられる。

(総括)

1. 高度毒素産生菌株を分離して、毒素を多量に含む菌体抽出液を得、さらに高速液体クロマトグラフィーを用いることによって、高度に精製されたENTXを再現性よく得る方法を確立した。
2. 精製ENTXを用いて、ENTXのHeLaおよびVero細胞に対する毒作用を解析し、その発現には細胞外液のCaが必須であることを見出した。
3. ENTXの細胞毒作用発現過程にはCa非依存性の初期段階とCa依存性の後期段階があることを明らかにした。

4. ENTX処理後の細胞内各種陽イオン量の変化を測定したところ、Ca, Na が細胞内へ流入すると同時に、K, Mg は細胞外へ流出していることが解った。

以上の結果から、ENTXは細胞膜の透過性を変化させ、細胞内へ多量のCaを流入させ、それによって細胞を致死させると考えられる。

論文の審査結果の要旨

A型ウェルシュ菌下痢原毒素の高度産生株を再現性よく選択し、毒素を高速液体クロマトグラフィーで高度純化した。次に精製毒素とHeLaおよびVero細胞を用いて本毒素作用をin vitroで解析し、本毒素作用にはCa²⁺が必須であること、毒作用過程にはCa²⁺非依存性および依存性の初期および後期段階があることを見出し、さらに膜のイオン透過性の変化を明らかにした。

本研究は、本毒素による下痢発症機構解明のための重要な研究であり、高く評価される。