

Title	破傷風神経毒素および毒素フラグメントの高速液体クロマトグラフィーを応用した精製法とそれらの作用の解析
Author(s)	小堤, 國廣
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35555
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)	小 堤 國 廣
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7482 号
学位授与の日付	昭 和 61 年 12 月 4 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	破傷風神経毒素および毒素フラグメントの高速液体クロマトグラフィー を応用した精製法とそれらの作用の解析
論文審査委員	(主査) 教 授 松田 守弘 (副査) 教 授 三輪谷俊夫 教 授 井上 公蔵

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

本研究の目的は、破傷風の病原因子である破傷風神経毒素を、普通行われている方法と異なり菌体から抽出し、高度に、かつ容易に精製する方法を確立し、このようにして得た精製毒素から従来精製が困難であった、毒素の重要な構造単位と考えられるフラグメント A-B (Frag. A-B) を分離精製し、それを用いて本毒素の構造と機能を明らかにするための基礎的知見を得ることにある。

[方 法]

1. *C. tetani*, Harvard A-47 微研亜株を Latham 変法培地で 35°C にて培養した。洗浄菌体を原培養の 1/30 容の 1 M NaCl-0.1 M クエン酸 Na に浮遊し、菌体抽出物を得た。毒素の菌体抽出物からの精製については、硫酸分画 (0~40% 飽和)、超遠沈分画、膜 (Acrodisc 0.2 μ, Gelman) 濾過後、HPLC 法により種々のカラム (東曹 G3000SW など) を用いて検討した。
2. 毒素にパパインを、パパイン : 毒素比 1/12.5~1/100 で 0.1 M NaK リン酸緩衝液, pH 6.5, 10 mM シス테인, 1 mM EDTA 中, 25°C, 5~16 時間作用させ、HPLC 法で、フラグメントへの分離の程度を確かめた上で、G3000SW カラムを用いてゲル濾過した。その Frag. A-B 分画を、さらに HPLC 用の hydroxylapatite カラム (KB カラム, 高研) を用い FPLC (Pharmacia) 装置を用いて 20 mM~200 mM のリン酸塩濃度勾配を用いて吸着クロマトグラフィーを行った。
3. 精製毒素または Frag. A-B の 5 μl を測定しようとするネコの *M. triceps surae* の運動ニューロンプールの近くに注入、同筋を支配する神経の刺激を Test 刺激 (T) として L7 前根より単シナプス反射 (MSR) を記録した。これに先立つ 1.2 msec 前に屈筋を支配する *N. peroneus* を刺激して

Conditioning刺激 (C) した。C-Tを与えた後、3秒後にT刺激のみ、その2秒後にC刺激のみを与え、これを1サイクルとして9秒毎にこれを休みなく繰り返し、15分毎の10サイクルの記録を平均した。

[成績]

1. 菌体内毒素の産生と菌体からの毒素抽出の至適条件：毒素収量を上げるためには45時間培養で自己融解を始める前に菌体を集めるのがよかった。培地中の成分の混入を避けるために、まず菌を洗浄し、次に菌浮遊液を0~4℃で攪はんすると、数時間~16時間で殆ど全部の毒素が抽出された。以後16時間抽出液を用いた。
2. 菌体内毒素のHPLCによる精製：菌体抽出物の硫酸分画濃縮物を超遠沈分画することにより、毒素蛋白以外の顆粒状菌体成分を除くことができ、またHPLCの前処置としての濾過が容易になった。ついでHPLC用G3000SWカラムでゲル濾過することにより、nickのないintactな、従来最もよいとされているUltrogel AcA34によるよりも高純度 ($1.5\sim 2.0\times 10^7$ マウスMLD/mg, 360~390Lf/mg, 免疫化学的およびゲル電気泳動法で単一の毒素10 mgを短時間 (1サイクル60分) で得ることができた。
3. Frag. A-BのHPLC法による分離精製：Frag. A-Bは、精製毒素をパパイン処理したものをG3000 SWカラムでゲル濾過することによって未分解残存毒素と異なるpeakとして分離できた。このpeakから得たFrag. A-B画分をHPLC吸着クロマトグラフィーによって更に精製できた：20 mM NaKリン酸緩衝液, pH 7.5で吸着、まず40 mMで標品中の残存毒素が溶出されてしまい、Frag. A-Bは100mMで溶出され、濃縮された精製標品として回収することができた。この標品を抗Frag. C抗体を結合したアフィニティカラムを通過させると、毒素が殆ど混在しない (残存毒素<0.003~0.5%) 精製Frag. A-B標品が得られた。
4. 精製Frag. A-Bの作用：精製Frag. A-B標品は、マウス静注 (30 μ g) で弛緩性マヒをおこさなかった。ネコの脊髄内に注入して単シナプス反射 (MSR)を調べた実験では、毒素は、注入後5時間以内にinhibitionがなくなり、15時間位からMSRが小さくなり始め、30時間位で消失したが、Frag. A-Bを注入した場合は、MSRとinhibitionがほぼ同時に平行して小さくなった。

この実験に用いた精製Frag. A-B標品は、ラットに100 μ lを筋注しても運動終板も遮断されず、破傷風の症状も現れなかった。

[総括]

1. 毒素を主成分とする菌体抽出液を菌自己融解前の若い菌体から得るための至適条件を見出し、菌体抽出液を出発材料とし、HPLC法を含む方法を応用して、破傷風毒素を高純度に短時間で精製する方法を確立した。
2. 高度精製毒素を穏やかにパパイン処理することにより、Frag. A-BとFrag. Cに解離し、HPLC法によるゲル濾過、吸着クロマトグラフィーによって、従来未解離残存毒素と分離不十分であったFrag. A-Bを高度に分離精製でき、さらに、Protein A-Sepharose CL-4 Bに抗Frag. Cを結合させたアフィニティカラムを通過させることにより、混在する毒素の殆どないFrag. A-B標品を調製することができた。

3. 上述の方法で得た高度精製Frag. A-Bは、マウス静注法で弛緩性マヒを示さなかったが、ネコ脊髄内に注入し、単シナプス反射（MSR）を調べた実験では、抑制（inhibition）がまずなくなりついでMSRが消失する毒素全分子の場合と異なり、MSRと抑制がほぼ同時に平行して小さくなることを見出した。

論文の審査結果の要旨

本研究は、まず、破傷風神経毒素の精製を、普通行われているように菌融解後の培養濾液を出発材料とするのではなく、融解直前の菌体抽出物を出発材料として行い、そのための至適条件を検討し、さらに高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を応用することによって、本毒素の極めて迅速、簡便な精製方法を確立した。次に、このようにして得た精製毒素を用いて、穏やかなパパイン処理による毒素フラグメントA-BのHPLCを含む方法による精製法を確立し、この方法によって得た精製フラグメントA-Bの活性を、電気生理学的に解析して、はじめて明確にとらえた。

以上の研究は、破傷風神経毒素作用機構の解明に大きく貢献するものであり、学位論文に値する。