



Title	Vibrio vulnificusの産生するproteaseに関する研究
Author(s)	三好, 典子
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36727">https://hdl.handle.net/11094/36727</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">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	三 好 典 子
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 8 3 1 2 号
学位授与の日付	昭 和 63 年 7 月 7 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	<i>Vibrio vulnificus</i> の産生する protease に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 近藤 雅臣 (副査) 教 授 岩田平太郎    教 授 三浦 喜温    教 授 内田   驍

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒言

*Vibrio vulnificus* は、低度好塩性の病原性ビブリオで、海水を本来の棲息域としており、夏期に河口水、沿岸海水などから多数分離される。本菌による感染症は創傷感染型と敗血症型に大別され、前者は、創傷部位の紅斑、浮腫の形成が主症状である。後者は、肝疾患などの基礎疾患がある場合に日和見的に発症し、症例数は多くないが死亡率は高く、ほとんどの症例で紅斑、水泡、蜂巣炎の形成など皮膚病変の併発が報告されている。従って、炎症反応を起こしうる物質が、本菌の重要な病原因子の一つであると考えられる。本菌は、cytolysin, protease など種々の因子を産生することが報告されており、このうち cytolysin はマウスに蜂巣炎を形成することが報告されている。一方、著者は、本菌の産生する protease に着目し、この protease を精製し、その性状、病原因子としての役割を検討した。

### 本論

敗血症患者の血液から分離した *V. vulnificus* L-180株を2% NaClを含むPY培地中で培養し培養上清を限外濃縮した後、DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィー、SephacrylS-200 カラムクロマトグラフィーおよびFPLC装置を用いたMono Q カラムクロマトグラフィーを行なうことによって、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で均一な1本のバンドを形成する段階まで精製した。また、この標品に対する抗血清は、未精製の酵素材料とゲル内沈降反応において1本の沈降線を形成した。従って、著者が行なった操作手順によって *V. vulnificus* の産生する protease は精製できたと判断した。比活性は、SephacrylS-200カラムクロマトグラフィーの段階で培養上清の約900倍に、二回目のMono Q カラムクロマトグラフィーの段階で約30,000倍に上昇し、回収率は29.6%だった。

精製した protease は、azocasein の他、type I insoluble collagen および elastin-Congo red も分解した。また、*V. vulnificus* 10株の培養上清を限外濃縮した材料と、著者が精製した protease に対する抗血清を用いてゲル内沈降反応を行なった結果、調べたすべての株が融合する1本の沈降線を形成した。従って、著者が精製した protease は、調べたすべての *V. vulnificus* が産生し、カゼイン、コラーゲン、エラスチンを分解することのできる protease であることが明かとなった。分子量は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった結果から約45,000であった。等電点は、両性担体として pharmalyte pH3-10 を用いて求めた結果5.80であった。

これまで報告されているすべての protease は、活性基の性質から四つのグループに分けられているので、*V. vulnificus* protease はどのグループに属するかを種々のプロテアーゼインヒビター、キレート剤および金属イオンを用いて検討した。その結果、*V. vulnificus* protease は、活性基に2価のカチオンとして、 $Zn^{2+}$  または  $Fe^{2+}$  あるいはその両方が関与している metal protease であると考えられ原子吸光分析を行なった結果、*V. vulnificus* protease 1分子中に約1原子の Zn を検出したが、Fe 原子は検出できなかった。また、この protease の合成基質に対する基質特異性は、これまで報告されている Zn 原子を必須成分として含有している protease の基質特異性と類似していたことから、*V. vulnificus* protease は、1分子中に1原子の Zn を必須成分として含有する metal protease であることが明らかにになった。

次に、*V. vulnificus* protease をモルモットおよびラットの皮膚に接種し、炎症反応が起こるか否かを調べた結果、この protease が0.3  $\mu$ g から10.0  $\mu$ g の範囲で濃度依存的に、血管などの組織破壊によって起こる出血斑、血管透過性の亢進によって起こる青色斑を形成することを認めた。*V. vulnificus* protease による血管透過性亢進反応の時間経過を調べた結果、モルモット、ラット共に青色斑は protease 接種後2分から形成され始め、10分間でプラトーに達した。従って、*V. vulnificus* protease による血管透過性亢進作用は、ヒスタミンあるいはブラジキニンのような短時間作用の血管透過因子を生成することにより起こると考えられた。

*V. vulnificus* protease による血管透過性亢進作用に対する抗ヒスタミン剤の影響を調べた結果、ラットの皮膚における青色斑の形成は抗ヒスタミン剤により抑制されたが、モルモットの皮膚における青色斑の形成は抗ヒスタミン剤ではほとんど影響されず、モルモットの皮膚における *V. vulnificus* protease の血管透過性亢進作用には、ヒスタミン同様短時間作用の血管透過因子であるブラジキニンの関与が考えられた。そこで、モルモットの皮膚における *V. vulnificus* protease の血管透過性亢進作用にブラジキニンが関与しているか否かを明らかにするため、キナーゼIIのインヒビターを用い、生成されたブラジキニンの不活化を阻害することによって血管透過性亢進作用が増強されるか否かを調べた結果、kininase II inhibitor を混合接種した場合は、明らかな青色斑形成の増強が認められた。また、血漿カリクレインの特異的なインヒビターである soybean trypsin inhibitor を用いて血管透過性亢進作用が抑制されるか否かを調べた結果、soybean trypsin inhibitor を混合接種した場合には、明らかな青色斑形成の抑制が認められた。更に、*in vitro* においてモルモットの血漿に *V. vulnificus* protease を加え、血漿プレカリクレインが血漿カリクレインに活性化されるか否かを調べた結果、この protease

によって血漿プレカリクレインが血漿カリクレインに活性化されることが示された。従って、モルモットの皮膚における *V. vulnificus* protease の血管透過性亢進作用は、血漿カリクレインーキニン系を活性化することにより生成したブラジキニンによって起こることが明らかになった。

### 論文の審査結果の要旨

*V. vulnificus* の産生する protease の精製、性状の解明を試み、病原因子としての役割について検討した。その結果、本 protease は検討したすべての *V. vulnificus* 株が産生し、1 原子の Zn を必須成分とする metal protease であることを明らかにした。また、この酵素はモルモット 及びラットの皮膚に対して血管透過性亢進作用を示すことを明らかにし、本菌の病原性のひとつが、この作用に起因して炎症を起こす結果となることを証明した。この成果は創傷感染の原因物質ならびにその機構を明らかにしたものといえ、薬学博士を授与するに値するものと判定した。