

Title	破傷風菌が産生する細胞溶解毒素テタノリジンの精製と精製毒薬を用いた作用の解析
Author(s)	中田, 滋子
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37171
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)	中 田 滋 子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9687 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	破傷風菌が産生する細胞溶解毒素テタノリジンの精製と精製毒薬を用いた作用の解析
論文審査委員	(主査) 教授 岡田伸太郎 (副査) 教授 松田 守弘 教授 三輪谷俊夫

論文内容の要旨

(目 的)

破傷風菌は、よく知られている破傷風神経毒素(所謂 破傷風毒素)以外に菌体外に、溶血毒素であるもう1つの毒素テタノリジンを産生することが知られている。この毒素は、コレステロールによって阻害をうけるチオール化合物で活性化される一群の溶血毒素の1つである。テタノリジンには溶血作用のほかに心臓毒性があることが報告されている。テタノリジンの精製については、これまでいくつかの報告があるが、その精製は十分ではなく、従来の方法では破傷風神経毒素の混入も避け難い。したがって、テタノリジン固有の毒素作用の本態は明らかではない。そこで本研究では、低神経毒素産生高テタノリジン産生破傷風菌株を用いてテタノリジンを至適条件下で産生させ、これを出発材料としてテタノリジン精製を試み、はじめて再現性よく高度に精製する方法を確立できた。さらに精製テタノリジンを用いてその性状を調べ、その作用を動物レベル、臓器レベル、細胞レベルで解析した。

(方法ならびに成績)

1. テタノリジンの産生

破傷風神経毒素の混入をできるだけ避け、精製のために適した出発材料をうるため土壌より分離した低神経毒素産生破傷風菌株K Z1143を Zeissler 血液寒天平板上に播き、最大の溶血斑を形成する集落からテタノリジン高度産生菌株K Z1143-2 (2,500HD₅₀/ml)を選択してテタノリジン産生に用いた。同菌を肝片加肝ブイオンで一夜培養後 Latham 変法培地で35°Cで培養、経時的にテタノリジンの産生を調べたところ、菌自己融解後に放出される神経毒素と異なり、極く早期に産生され18~22時間で最高値に達することがわかったので、この至適条件下での培養上清をテタノリジン精製の出発材料とした。溶

血活性は被検溶液を 5 mM シス테인加 5 mM トリス-塩酸緩衝 (pH7.0) 食塩溶液で倍数希釈したものを等容量 1% ウサギ赤血球 (同緩衝食塩溶液で洗浄) と混合 37°C, 1 時間インキュベートし, 遠沈上清を Titertek multiskan で Absorbance 540nm で推定し HD_{50} を計算した。

2. テタノリジン精製と精製毒素の性状

培養上清を順次, 硫酸分画 (0~60% 飽和→10~40% 飽和), 1 mM DTT 加 20mM トリス緩衝液 pH8.2 での DEAE-セファデックス A-25 通過によるイオン交換クロマトグラフィー, Amicon PM 30 メンブレン濃縮, セファデックス G-75 ゲル濾過 (1 mM DTT 加 5 mM トリス緩衝液 pH7.0), Hi Load Superdex 200 (同上緩衝液) による FPLC および Amicon PM30 メンブレン濃縮によって精製した。精製毒素は SDS-PAGE で分子量 63,000 の一本の蛋白バンドとして泳動した。精製毒素は寒天ゲル内で抗-粗毒素ウサギ血清と一本の沈降線を形成し, 且つ抗体による溶血活性中和非中和領域の境界がその沈降線に一致した。精製標品の比活性化は $2,800 HD_{50} / \mu g$ 蛋白と極めて高くこれまで報告されている標品 ($300 \sim 800 HD_{50} / \mu g$ 蛋白) よりもはるかに高度に精製されていることがわかった。この方法によるテタノリジン標品の比活性は培養上清の 1,750 倍であり収量率は 27% であった。

3. 精製テタノリジンの作用

- 1) 動物レベルでの解析: 精製毒素 ($1,600 HD_{50}$, 約 600ng) をマウス (ddy OF 1) に静脈内投与すると, 急速 (1~2 分) に死亡させた。LD₅₀ は約 $600 HD_{50}$ ($\approx 200ng$) であった。精製毒素 $13,000 HD_{50}$ ($4.6 \mu g$) をラット (SD) に静脈内投与すると直ちに一過性の急速な血圧の降下が生じ次いで ECG の著名な変化 (徐脈, 不整脈) をおこして約 10 分で死亡させた。
- 2) 臓器レベルでの解析: 精製毒素 ($26 HD_{50} / ml$) を単離したラット心臓標本 (Langendorff preparation) に還流すると直ちに急速な還流圧上昇と張力低下および心拍出圧の低下と心収縮圧の低下が認められた。
- 3) 細胞レベルでの解析: i) 培養ラット胎児心筋細胞にテタノリジン ($160 HD_{50} / ml$) を添加すると 30 秒後に心筋細胞の収縮運動が消失しさらに 4 分後には著しい形態変化壊死がみられた。 $3.2 HD_{50} / ml$ および $32 HD_{50} / ml$ のテタノリジンで処理した心筋細胞からの細胞内膜電位記録からは静止膜電位の上昇と活動電位の振幅の狭小化が認められ (各々処理後 21, 2 分), ついに静止膜電位及び活動電位の消失が見られた。(各々処理後 22, 9 分)。ii) 培養細胞株 (Vero 細胞) に精製毒素を作用させると細胞外 Ca^{2+} に依存性に, 毒素量に依存して急速 (1~5 分) に細胞の特異な形態学的変化 (bleb, balloon 形成) をおこした。この変化は分子量 19,500 の dextran を細胞外に添加すると阻止することができたが分子量 9,400 の dextran およびそれ以下の分子量の物質では阻止できなかった。形態学的変化を阻止する条件下でも, トリパンプルー (分子量 960) を exclusion でできなかった。Vero 細胞の浮遊液に毒素を作用させたところ, 細胞外 Ca^{2+} 非存在下で毒素量に応じてトリパンプルーで染色される細胞数が増加し, CD₅₀ は $60 HD_{50} / ml$ ($21ng / ml$) であった。

(総括)

1. 低神経毒素産生高度テタノリジン産生破傷風菌株を用いて, 至適条件下でテタノリジンを産生し, 硫酸分画, イオン交換クロマトグラフィー, ゲル濾過, FPLC-ゲル濾過を組み合わせることによ

て、高度に精製されたテタノリジンを再現性よく得る方法を確立した。

2. 精製毒素を用いて、その作用を動物レベルで解析し、本毒素がラットに急性の血圧降下をおこすことをはじめて見出した。本毒素は、単離された還流ラット心臓 (Langendorff 標本) にも極めて微量で働き、急速にその活動を停止させ、また培養ラット胎児心筋細胞に作用して、心筋の収縮運動の消失、静止膜電位の上昇、活動電位の消失をおこした。
3. 培養細胞 (Vero 細胞) で本毒素の作用を解析したところ、本毒素の primary な作用は細胞外 Ca^{2+} の非存在下で細胞膜に大きな孔 (分子量約 1 万を通過させる) をあけることで、ひきつづいて Ca^{2+} 依存性に二次的に細胞の形態学的変化をおこし、細胞を致死させることがわかった。

以上の結果、テタノリジンの病態生理学的活性を研究する基礎ができた。

論文審査の結果の要旨

テタノリジンの産生を、破傷風神経毒素非産生株と低産生株を用いて調べた。低神経毒素産生高テタノリジン産生破傷風菌亜株の培養上清から硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過にて精製し、その物理化学的、抗原的な性状を研究した。高度精製標品を用いて、テタノリジンの作用機構をラットおよびその単離心臓と培養細胞で解析した。テタノリジンをラットに静脈内投与すると、血圧の急激な降下と心電図の変化をおこして急速に死亡させた。テタノリジンは、細胞外液に Ca^{2+} 無添加の状態で一次的に組織培養細胞を分子量約 10,000 以下の物質に透過性にし、細胞外液への Ca^{2+} の添加により二次的に細胞に著名な形態変化をおこすことを見いだした。テタノリジンに関するこれらの知見はいずれも新しく得られたものであり、学位取得に値する論文である。