



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒及び関連毒素に関する分子生物学的研究   |
| Author(s)    | 飯田, 哲也   |
| Citation     | 大阪大学, 1991, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/37198">https://hdl.handle.net/11094/37198</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) | 飯                              | 田    | 哲 | 也 |
| 学位の種類   | 医                              | 学    | 博 | 士 |
| 学位記番号   | 第                              | 9672 | 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 病理系専攻                    |      |   |   |
|         | 学位規則第5条第1項該当                   |      |   |   |
| 学位論文題目  | 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒及び関連毒素に関する分子生物学的研究 |      |   |   |
| 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)

腸炎ビブリオの產生する耐熱性溶血毒 (TDH) は、本菌による急性胃腸炎の重要な病原因子と考えられている。当初、TDHを產生するのは腸炎ビブリオのうちのある特定ポピュレーション (神奈川現象陽性株: KP<sup>+</sup>) であると考えられていた。しかし近年、モルジブ旅行者より分離されたKP<sup>-</sup>腸炎ビブリオの產生するTRH (TDH-related hemolysin) をはじめとして、KP<sup>-</sup>の腸炎ビブリオや腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌がTDHに関連した多様な溶血毒を產生することが報告され、TDH-ファミリー毒素ともいえる広がりが明らかになりつつある。現在までに報告されたこれら一群のTDH-ファミリー毒素はすべて165個のアミノ酸よりなり免疫学的及び生物学的性状が類似している。

本研究ではこれらの毒素の構造と機能の関連について解析することを目的とし、TDH-ファミリー毒素のプロトタイプであるTDH、および溶血活性の標的赤血球特異性がTDHと異なるTRH、の各構造遺伝子 (tdh, trh) をクローニングした。これら遺伝子を用いて、毒素分子中の、1) 生物活性 (溶血活性) 発現に重要な構造、及び、2) 標的赤血球の特異性を決定している構造について解析を行なった。

#### (方法ならびに成績)

##### 1. tdh, trh 遺伝子のクローニング

a) tdh 遺伝子: KP<sup>+</sup> 腸炎ビブリオT4750株のtotal DNAよりDNAライブラリーを作製し、ウサギ赤血球に対する溶血活性を指標としてクローニングを行なった。T4750株は2コピーのtdh 遺伝子 (tdhA, tdhS) を有していたが、T4750株では主に tdhA が発現されていることが示唆されたので、これを以下の実験に用いた。

b) trh 遺伝子：下痢患者由来のKP<sup>-</sup> 腸炎ビブリオAQ4023株よりDNAライブラリーを作製し、tdhA 遺伝子内のTaqI-HinfI 断片をプローブとしてクローニングを行なった。

c) 推定アミノ酸配列の比較：tdhA, trh 共にコードする成熟タンパクは165個のアミノ酸残基よりなり、67%の相同性を有していた。

## 2. TDHの溶血活性に関する構造の解析

tdhA を有するプラスミドを in vitro で hydroxylamine 处理することにより tdhA 内にランダムに突然変異を導入し、これを大腸菌内で発現させ溶血活性の低下したクローンを分離した。得られた変異 tdhA の塩基配列を一連の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして決定した。その結果、Thr<sup>67</sup>, Gly<sup>86</sup>, Glu<sup>116</sup> が TDH の活性に重要であることが明らかになった。

## 3. TRHの標的赤血球特異性を決定する構造の解析

TDH と TRH の標的赤血球特異性の違いを解析するために遺伝子組換えにより TDH-TRH 間の一連のキメラ毒素を作製した。tdhA, trh 両遺伝子の制限酵素地図を比較したところ、gene fusion に利用できる適当な制限酵素切断部位は存在しなかった。そこで、site-directed mutagenesis により tdhA 内に新たに 3 種の制限酵素切断部位を付加し、これらの部位を用いて gene fusion を行なった。作製された 8 種類の fusion 遺伝子の産物を解析した結果、TRH の特徴であるヒツジ赤血球に対する高い溶血活性は TRH 分子中の N-末端より 33-89 位の領域によるものであり、この内の 33-63 位と 67-89 位にそれぞれ 1 残基以上の必須なアミノ酸残基が存在することが明らかになった。

(総括)

1. TDH, TRH の各構造遺伝子をクローニングした。クローニングされた各遺伝子はそれぞれ 189 個のアミノ酸よりなるポリペプチドをコードしており、シグナルペプチドを除く 165 残基のアミノ酸配列は 67% の相同性を示した。
2. 突然変異をランダムに導入することにより得た溶血活性の低下した変異 TDH の解析の結果、TDH の溶血活性に重要であると考えられる TDH 分子中のアミノ酸残基が明らかになった。
3. 標的赤血球の特異性に関する TRH 内の構造を、遺伝子組換えにより作製した一連の TDH-TRH キメラを解析することにより明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

腸炎ビブリオの產生する耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin: TDH) 並びに易熱性 TDH 類似溶血毒 (TDH-related hemolysin: TRH) は、本菌の感染発症過程において重要な役割を演じる病原因子であるが、その活性発現のメカニズムにはいまだ不明な点が多い。

本論文は、遺伝子側から TDH 及び TRH の構造と機能についての解析を行い、1) TDH の溶血活性発現に重要な構造、及び、2) TRH のヒツジ赤血球に対する特異性を決定している構造を明らかにしたものである。

本研究で得られた成績は、TDH関連毒素の作用メカニズムの解明に重要な手がかりを与えるものである。さらに、キメラタンパクの作製など本研究で用いられた遺伝子組み換えの手法はタンパク質の構造と機能を解析する上で広く一般に応用しうる有効な方法である。

本論文は博士論文に値するものと考える。