



Title	腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒ヘモリシンの構造と機能
Author(s)	高蔵, 晃
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37234
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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)	高 藏	ひかる 晃
学位の種類	理 学 博	士
学位記番号	第 9340	号
学位授与の日付	平成 2 年 9 月 30 日	
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 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ヘモリシンの構造と機能	
論文審査委員	(主査) 教授 崎山 文夫	
	(副査) 教授 福井 俊郎 教授 松原 央	

論文内容の要旨

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) が产生する耐熱性溶血毒ヘモリシン (Vp-TDH) は溶血活性のみならず、高度の耐熱性と即時型心臓毒性を有し、本菌の主要な病原因子と考えられている。165アミノ酸残基から成るVp-TDHの一次構造は既に決定されているが、本毒素の構造と機能の相関は未だ不明な点が多い。本研究では、Vp-TDHの構造機能相関を明らかにすることを目的として、生物活性の異なる3種の変異ヘモリシン (m-TDH, Vp-TRH, Vp-TDH/1) の一次構造を決定した。さらに、それらの構造と既に明らかとなっているヘモリシンの構造の比較から、ヘモリシン活性の発現と密接な関連が予想されるペプチド領域を選び、それらを化学合成してVp-TDHの毒素特性と比較検討した。

I 変異ヘモリシンの一次構造決定と構造比較

一次構造の決定は、主に変異ヘモリシンを *Achromobacter* プロテアーゼ I により消化し、得られるペプチドのアミノ酸配列を気相式シーケンサーで分析することにより行った。この結果、165残基から成る各変異ヘモリシンの全アミノ酸配列が明らかとなった。本研究で決定した3種の変異ヘモリシン及び、既に明らかとなっている Vp-TDH, Vh-r TDH の一次構造比較と生物活性の相違から、Gly 90 とその近傍領域がヘモリシンの溶血活性の発現において何らかの役割を果たすことが示唆された。そこで Tyr 79~Ser 98 に相当するペプチドを化学合成し、これらのペプチドとヘモリシンの機能との関係を検討した。

II ヘモリシン活性領域の検索

合成ペプチドの溶血阻害実験の結果から、合成ペプチドはヘモリシンと同様の機構で赤血球膜上の特

定の部位に結合し、競争的に溶血阻害を引き起こすことが明らかとなった。又、合成ペプチドの溶血活性、心臓毒性実験の結果から、合成ペプチドが溶血活性のみならず心臓毒性も有することが明らかとなつたが、それらの作用機構がヘモリシンの作用機構と類似のものであるか否かを判断することは困難であった。

以上の実験結果から、ヘモリシンの Gly 90 とその近傍領域が、本毒素の赤血球膜への結合において重要な役割を果たす必須の機能単位であることが明らかとなった。又、本研究で設計・合成したペプチドに関する研究は、ヘモリシンの構造と機能の相関を解明するために有効な研究手段であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

腸炎ビブリオは食中毒の原因菌で、その毒性は耐熱性の蛋白質に起因する。この毒蛋白質はすでに精製され、精製毒素は赤血球を溶血させ（ヘモリシン（Vp - TDH）），心臓毒性を示す。Vp - TDH は同一のサブユニットから成る二量体で、165残基から構成されるサブユニットの一次構造も明らかにされている。しかし、この蛋白質が毒性を発現するメカニズムは不明である。本論文は、この点を解明することを目的とし、Vp - TDH の三種の変異体（無毒性の m - TDH および種特異性を異にする Vp - TRH と Vp - TDH/I）の一次構造の比較とそれらの構造比較により示唆された 90 位残基の重要性について検討したものである。

高蔵君は、上記の三種のヘモリシンの構造の違いを明らかにするため、まず一次構造解析を行ったが、この解析では、試料に制限があったため、種々の工夫を行いつつミクロ分析を実施し、いずれの蛋白質も数ナノモルの試料で全アミノ酸配列を決定した。その結果、Vp - TDH と m - TDH は 90 位残基のみが異なることが判明し、Gly 90 → Asp 置換が溶血活性を著しく低下させることがわかった。溶血活性を持つ他の二種の蛋白質には複数の残基の置換が認められたが、Gly 90 は保存されていた。さらに、高蔵君は、ヘモリシンの毒性発現における Gly 90 の重要性を確認するため、この残基を含むペプチド（79 位から 98 位に相当）を化学合成し、それらの生理活性を調べた。その結果、m - TDH に由来するペプチドを除く全ペプチドが、低濃度ではヘモリシンによる溶血活性の阻害を、高濃度では溶血活性、心臓毒性をそれぞれ有することを見いだした。

以上のように、高蔵君は、腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒ヘモリシンについて、多くの示唆に富む新事実を明らかにした。これらの知見はこの蛋白質の毒性発現のメカニズムの分子レベル、細胞レベルでの解明に資するものであり、本論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。