



Title	Vibrio cholerae non-01 の產生する Hemagglutinin /Proteaseの解析
Author(s)	中, 篤子
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37958
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	なか あつ こ 中 篤 子
博士の専攻	博士 (医学)
分野の名称	
学位記番号	第 10169 号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科 病理系専攻
学位論文名	<u>Vibrio cholerae</u> non-O1の產生する Hemagglutinin/Protease の解析
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 井上 公藏 教授 松田 守弘

論文内容の要旨

(目的)

V. cholerae non O1 (NAGビブリオ) は食中毒や海外旅行者下痢症の原因菌の一つとして知られ、コレラ菌の水様性下痢の他、粘血性下痢、腹痛など多彩な症状を呈する。これまでに NAG ビブリオは、種々の毒素や毒性物質を產生することが知られているが、下痢発症機序はまだ未確定の要素が多い。コレラ菌の產生する Hemagglutinin/Protease (Vc-HA/P) がコレラ菌の病原因子の一つと考えられているが、本研究では NAG ビブリオも Protease を產生することに着目し、①NAG ビブリオが產生する Hemagglutinin/Protease (NAG-HA/P) を単離、精製し、その性状を明らかにすると共に、②病原因子としての可能性を追求した。

(方法ならびに成績)

1. 精製と性状

a) 旅行者下痢患者下痢便から分離された V. cholerae non-O1菌株 #81を tryptic soy broth に接種し、30°C20時間振盪培養して得られた培養上清の硫安分画 (40-55%) を出発材料として、DEAE-Sephadex A25, SephadexG100によるカラムクロマトグラフィー、更に MonoQ 及び phenyl Superose カラムを用いた HPLC で精製した結果、NAG-HA/P は SDS 電気泳動にて分子量32K の単一バンドとして泳動された。NAG-HA/Pは32Kのサブユニットが5個より成るペントマー構造を有し、70°C10分間の加熱で失活する易熱性蛋白であった。メタロプロテアーゼの性状を示し、protease 活性の至適 pH は 6-9 であった。また、ニワトリ赤血球凝集能 (HA) を有していた。これらの性状は、Vc-HA/P の性状と一致すると共に、NAG-HA/P 及び Vc-HA/P で免疫して

得られた抗家兎血清を用いて解析した結果、両者は免疫学的にも同一であることが示唆された。

b) 精製 NAG-HA/Pを抗原として Balb/c マウスを免疫してモノクローナル抗体 (2.4.1 及び 2.4.2 の 2 つのクローニ) を作製した。2.4.2 をリガンドしたアフィニティカラムを作製し、NAG-HA/P をより簡便に精製する方法を確立した。この方法で精製した NAG-HA/P は SDS-PAGE 上で 2 本のバンド (32K, 34K) に泳動された。34K 蛋白の保温 (37°C) 後、SDS-PAGE で解析した結果、時間経過と共に 32K 蛋白はシフトした。この変化に伴う protease 活性は、azocasein 法でほとんど変化が認められなかったが、HA 活性をマイクロタイマー法にて調べたところ低下傾向がみられた。両蛋白の抗原性の異同をゲル内沈降反応で調べたところ単一の fuse する沈降線が形成された。これらの結果より 34K 蛋白は HA 及び protease 活性の両活性 (bifunctional) を有し、自己消化により 32K 蛋白に変化するものと推定された。また、モノクローナル抗体を用いて中和テストを行った結果、この物質のもつ二つの生物活性と関連した活性基は異なる位置に存在することが示唆された。

2. 病原因子としての解析

a) コレラ類似毒素 (LT) の活性；Enterotoxigenic *E. coli* #240 株の產生する易熱性エンテロトキシン (LT) を CAYE 培地で 20 時間振盪培養後集菌し、Bio-Gel A 5 m カラムクロマトグラフィーを用いてニックの入っていない A サブユニットをもつ LT として精製した。精製 LT を NAG-HA/P と混和、保温し SDS-PAGE で解析した結果、時間の経過と共にニックの入った A サブユニットが出現し、これに伴い LT の CHO cell への形態変化活性が上昇した。このことは HA/P が LT 毒素の活性化作用を有することを示すものである。

b) エルトール型ヘモリジンの活性化

V. cholerae O1 N86 株を Syncase 培地で 48 時間静置培養した培養上清から得た精製エルトール型ヘモリジンおよび *V. cholerae* O1 N86 株のヘモリジン構造遺伝子 (hlyA) を大腸菌で発現させて得た精製 HlyA 蛋白は、各々 SDS-PAGE で分子量 65K および 80K の位置に一本のバンドとして泳動された。この 80K (HlyA) 蛋白を NAG-HA/P と混和し、保温後、SDS-PAGE で解析した結果、HlyA 蛋白はエルトール型ヘモリジンの分子量 65K に泳動される蛋白に変化し、これに伴い溶血活性も上昇した。

c) ヒト分泌型 IgA (SIgA) の分解作用

ヒト SIgA を NAG-HA/P と混和、保温し SDS-PAGE で調べたところ、secretory component や heavy chain に相当するバンドが分解消失されるのが認められた。

(総括)

- 1) *V. cholerae* non-O1 の產生する Hemagglutinin/Protease (NAG-HA/P) の簡便な精製法を確立した。
- 2) NAG-HA/P は MW34K 蛋白として產生され、一部自己消化をうけ 32K 蛋白になり、その変化に伴い、HA 活性は減少傾向を示すのに対し protease 活性には変化が認められなかった。
- 3) NAG-HA/P はサブユニット 5 個から成るペントマー構造をとりメタロプロテアーゼの性状を示

す易熱性蛋白で、免疫学的、物理化学的にコレラ菌の產生する HA／Pと同一であった。

- 4) HA と protease の二つの生物活性をになう活性基は異なる位置に存在することが示唆された。
- 5) NAG-HA／Pはコレラ毒素類似毒素 (LT) のAサブユニットにニックを入れ活性化させた。
- 6) エルトール型ヘモリジンの前駆体である80K のHlyA 蛋白を部分分解し、活性型の MW 65K 蛋白に変化させ、溶血活性を上昇させた。
- 7) NAG-HA／P はヒト分泌型 IgA 分解活性を有した。

論文審査の結果の要旨

食中毒の海外旅行者下痢症の原因菌の一つである Vibrio cholerae non-O1は、種々の毒素や毒性物質を產生することが知られている。しかし、本菌感染症の病態を十分説明できるに至ってない。本研究では V. cholerae non-O1が產生する Hemagglutinin／Protease を単離精製してその諸性状を明らかにするとともに病原的意義についても検討を加えた。その結果、コレラ菌の產生する Hemagglutinin／Proteaseと免疫学的、物理学的性状が同一であること、コレラ類似毒素Aサブユニットにニックを入れ活性すること、エルトール型溶血毒をプロッセシングして活性化すること、ヒト分泌型 IgA の分解活性があることなどを明らかにし、Hemagglutinin／Protease が V. cholerae non-O1の病態に深く関わっていることが示唆された。

以上の知見は V. cholerae non-O1による下痢発症機序の解明に有力な手掛かりをあたえるものであり、学位論文に値するものである。