



Title	Role of TraT Protein, an Anticomplementary Protein Produced in Escherichia coli by R100 Factor, in Serum Resistance
Author(s)	Patcharin, Pramoonjago
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37960
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	パチャリン プラムー シャゴ Patcharin Pramoonjago
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10170 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	Role of TraT Protein, an Anticomplementary Protein Produced in Escherichia coli by R100 Factor, in Serum Resistance (R100因子により大腸菌に形成される抗補体蛋白であるTraT蛋白の血清抵抗性に占める役割について) (主査) 教授 井上 公藏 (副査) 教授 木下タロウ 教授 平野 俊夫
論文審査委員	

論文内容の要旨

(目的)

多剤耐性因子RプラスミドのtraT遺伝子産物は、プラスミドの接合伝達に際して表面排除に働く外膜蛋白であることが知られているが、補体による殺菌作用に抵抗性を与える事も知られている。TraT蛋白による補体抵抗性を解析するために次の研究を行った。

(方 法)

菌及びプラスミド：R100のtraT遺伝子をpUC19に挿入したプラスミドpS178をE.coli K12, W3110に導入したもの被検株とした。対照株としてpUC19をW3110に導入したもの用いた。これら両株は、プラスミドの脱落を避けるためampicillin加trypticase soy agarで保存された。TraT発現株はglucose-tryptone L brothでのovernight cultureをlactose-tryptone L-brothで20倍に希釀後、2.5時間培養して得た。

抗TraTモノクローナル抗体：既知の遺伝子構造(Ogata et al.J.Bacteriol. 151:819, 1982)からsynthetic partial peptide, TraT [86-99]を合成し、これに対するマウスモノクローナル抗体(211-2)を作製した。この抗体を用いてimmune blotting法によりTraTを追跡し、tentativelyにTraT蛋白を精製し、これを免疫原としてintact native TraTに対するマウスモノクローナル抗体を6クローン得た。

TraT蛋白の精製：TraT発現大腸菌の膜画分を1% sucrose mono-laurateで溶解後、イオン交換及び、ゲルfiltration chromatographyにて精製した。その間、detergent濃度を徐々に下げて、最終標品では、0.02%とした。これにはendotoxin lipopolysaccharideは含まれていなかった。

補体及び溶血系： モルモット及びヒト新鮮血清を補体源とし、これらの補体成分は、既知の方法で分離精製し、或は、 Diamedix, Miami, Florida から購入した。反応中間生成赤血球は常法通り作製した。
(結果及び考察)

1. TraT 蛋白は、その発現菌にモルモット補体血清による殺菌を抑制し、ヒト補体血清-Mg -EGTA による alternative pathway を経ての殺菌をも抑制した。
2. 抗 synthetic peptide モノクローナルは変性 TraT 蛋白とのみ反応し、native TraT とは反応しなかった。

精製 TraT に対する 6 種のモノクローナル抗体は何れも native TraT 蛋白と反応し、生菌上の TraT 蛋白とも反応した。これらの抗体から作製した Fab 画分はモルモット補体血清による殺菌作用に対する菌体表層上の TraT 蛋白による補体抵抗性を抑制した。

3. TraT は E.coli 外膜の Braun の lipoprotein 類似のリボ蛋白であるが、赤血球に加えても血球膜には取り込まれなかった。
4. 精製 TraT 蛋白はモルモット補体血清による感作血球の溶血を抑制し、ヒト補体血清による alternative pathway を経ての溶血をも抑制した。
5. 精製補体成分及び反応中間生成赤血球を用いて、TraT 蛋白の反応抑制段階を解析したところ、TraT 蛋白の主要な抑制段階は、C6 活性化段階、または、C5 b 6 complex 形成段階である事が決定された。C4, C5 及び Factor 反応段階にも抑制傾向が認められた。

論文審査の結果の要旨

大腸菌の多剤耐性プラスミド R100 の表面排斥に関与する TraT 蛋白は補体による殺菌作用にも抵抗性を与える事が知られている。この蛋白の既知の遺伝子構造から、部分ペプチド TraT [86-99] を合成しそれに対する单クローン抗体を得た。この抗体は変性蛋白とのみしか反応しなかったが、immune blotting に用い得たので、これを用いて TraT 蛋白を精製して、粗精製蛋白を得、更に、この蛋白に対する单クローン抗体を作成し、これら抗体を用いる ELISA を考案して、TraT 蛋白を追跡して、TraT 蛋白の精製法を確立した。

精製 TraT 蛋白を補体による溶血系に導入し、補体活性化の各反応段階に対する抑制効果を解析して、TraT 蛋白は、C6 段階を強く抑制し、C4, C5, factorB 段階をも或程度抑制する事が見いだされた。

従って、TraT 蛋白は、C5 b 6 複合体形成を阻害するか、C5 b 6 複合体の構造を変化させて不活性な複合体にする事によって、補体活性化を C6 段階で遮断する事により、補体の殺菌作用に対する抵抗を与えると考えられる。