Osaka University Knowledge Archive

Title	Studies on Heat-stable Enterotoxin : Molecular Structure and Function
Author(s)	佐藤, 孝
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39060
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【17】

氏　　名	佐藤　孝（さとう　たかし）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　11729　号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科有機化学専攻
学位論文名	Studies on Heat-stable Enterotoxin : Molecular Structure and Function **（毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシンの分子構造とその活性発現機構に関する研究）**
論文審査委員	（主査） 教　授　下西　康嗣 （副査） 教　授　楠本　正一　　教　授　相本　三郎

論文内容の要旨

耐熱性エンテロトキシン（ＳＴ）は，毒素原性大腸菌を始めとする種々の腸管感染菌によって産生されるペプチド毒素であり，人や家畜に急性の下痢疾患をもたらす。ＳＴの作用は，腸管上皮細胞膜上に存在する膜一回貫通型受容体，グアニル酸シクラーゼ（ＧＣ－Ｃ）に結合し，これを活性化することにより引き起こされる。申請者は，ＳＴの受容体による被分子認識機構，及びその活性化機構について，分子構造レベルでの情報を得ることを目的として，その立体構造－機能相関の研究を行なった。

初めに，毒素分子の構造機能相関の基礎となるべき毒性発現領域の結晶化を試み，天然毒素と同等の活性を有するその脱アミノ体，[Mpr^5] STp（5－17）についてその水溶液から0.89Åの回折像を与える結晶を得ることに成功した。申請者は，構造解析の結果明らかにされた本毒素の高度に折りたたまれた特異な分子構造をもとに，これまで知られている構造－機能相関の知見を考え合わせ，ＳＴの受容体結合部位を推定した。

次に，この推定受容体結合部位に含まれるアミノ酸を置換することによって，活性を低下，或いは欠如させたアナログの分子構造を解析し，これらの立体構造が，上記の［Mpr^5］STp（5－17）の構造と事実上同一であることを明らかにした。この結果は，アミノ酸置換による劇的な活性の変化が，その立体構造の違いによるものではなく，置換部位における側鎖構造の僅かな差異に起因することを示している。さらに，これら3つの分子の結晶構造の差異を詳細に検討することによって，本毒素に潜在的に存在する構造のフレキシビリティー，及び金属イオン結合部位の存在を明らかにした。これらの結果は，上記の受容体結合部位に関する仮説を裏付けるだけでなく，従来の対立する実験事実に基づく二つの推定活性発現機構（受容体グアニル酸シクラーゼ説，カルシウムイオン説）をいずれも矛盾無く統括，説明し得る可能性を持っており，その機能の本質的理解への糸口を見いだすことが出来たと考えられる。

以上の結果は，ＳＴの構造と機能との関連において明快な解答を与えたが，それと同時に，結晶化の困難さを克服するために行った，上記のＮ末端脱アミノ化アナログの立体構造が天然毒素とは異なる可能性をも示唆した。この問題に答えるべく，Ｎ末端に修飾を行っていない毒性発現領域の結晶化を長期にわたって試みた結果，疎水性溶媒環境下において構造解析に使用可能な単結晶を得ることに成功した。解析の結果は，問題となった修飾が毒素の立体構造に影響を及ぼさないことを証明すると共に，意外にも，ＳＴが疎水性環境下で自己会合し，円筒状6量体構造を形成することを明らかにした。この構造において，ＳＴ分子表面における疎水的部位でもある受容体結合部位は，特異的にその外縁部を構成していることから，分子量2000に満たない本毒素が，自己集合体を形成することによって巨大な

受容体蛋白質を会合させる核として機能し，受容体細胞内領域を活性化する可能性，あるいは，結合による受容体活性化と平行して，新奇な細胞膜透過機構を有するイオノホアー（チャネル）として作用することにより受容体のシクラーゼ活性を増強し，その異常な細胞応答を引き起こす可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシン（ＳＴ）は，小腸上皮細胞膜上に存在する膜結合型グアニル酸シクラーゼに結合し，細胞内cGMP濃度の上昇とともに細胞内から外への電解質の分泌促進をもたらし，ひいては幼児や家畜に急性の下痢をおこすペプチド性毒素で，分子レベルで生理機能の解明が望まれている。

佐藤孝君は，ＳＴの分子構造とそれに基づくＳＴとグアニル酸シクラーゼとの分子間相互作用を解明することを目的として，ＳＴの毒性発現ドメインについて毒性の異なる数種のアナログのＸ線結晶構造解析を詳細に行い，１）ＳＴには三つの構造セグメントが存在し，それらが三つの分子内ジスルフィド結合によって強く保持されていること，２）三つの構造セグメントは独立した機能，すなわち，Ｎ端部は分子全体の構造保持，中央部はグアニル酸シクラーゼとの相互作用，Ｃ端部はイオノフォアペプチド様構造としての機能を示すこと，３）毒性ドメインは６量体を形成し，それによってグアニル酸シクラーゼの分子会合を誘導し，ＳＴの作用を細胞内へ伝達する機能をもつ可能性を見いだした。

以上のように，本論文は，耐熱性エンテロトキシンの分子構造を解明するとともに，その機能についても新しい知見を与えており，博士（理学）の学位論文として充分価値あるものと認める。