

Title	分子内シャペロンとしてのコレラ菌エルトル溶血毒プロ領域の機能解析
Author(s)	永宗, 喜三郎
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39846
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	なが 永 宗 喜 三 郎
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12379 号
学位授与年月日	平成8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	分子内シャペロンとしてのコレラ菌エルトール溶血毒プロ領域の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 松田 守弘 教授 品川日出夫

論文内容の要旨

【目的】

コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) が産生、分泌する病原因子の一つにエルトール溶血毒がある。この溶血毒の構造遺伝子 (*hlyA*) は741個のアミノ酸からなる約82kDaのタンパクをコードしている。*hlyA* 遺伝子産物は、菌内膜通過の際、N末端から25個のアミノ酸が切断され、約79kDaのタンパク(プロトキシン)として、菌体外に分泌される。その後、プロトキシンは更に切断を受け、約65kDaの成熟型毒素となり活性毒素として機能する。この2段階プロセッシングのうち、最初のプロセッシングは内膜通過のためのシグナルペプチドの切断であると考えられるが、2度目のプロセッシングの意義やこのプロセッシングによって切断される領域(プロ領域)の役割は全く不明である。そこでプロ領域の意義を探るため、この領域の毒素の立体構造形成に果たす役割について解析を行なった。

【方法ならびに成績】

①プロ領域欠失変異株の作成及び解析 *V. cholerae* O1 biotype El Tor, N86株の *hlyA* からプロ領域をコードする部分のみを欠失させた変異株を作成した。この変異株は培地中での増殖は親株と変わらなかったが、血液寒天培地上での溶血能は1/14に低下していた。またこの変異株と親株とを pulse-chase 法及び Western blot 法により解析した結果、この変異株は毒素を菌体外に分泌しておらず、その代わりにペリプラズム中に多量の分解産物とおもわれる蓄積が見られた。

②プロトキシン及び成熟型毒素の変性-再構成実験 エルトール溶血毒の成熟型毒素及びプロトキシンを各々6M塩酸グアニジンにより変性させ、その変性溶液を60倍に希釈し塩酸グアニジン濃度を低下させた後、回復した毒素活性を羊赤血球に対する溶血活性により測定した。プロトキシンは塩酸グアニジンにより変性させても希釈後の溶血活性に変化は見られなかった。一方成熟型毒素では変性-希釈処理により活性の大半が失われた。即ちエルトール溶血毒のプロ領域は毒素の変性状態からの回復、即ち立体構造形成に必須であることが示唆された。

③プロ領域と分子シャペロンとの相同性 以上のようなプロ領域の成熟毒素部分に対する立体構造形成作用は分子シャペロンと呼ばれる一群の蛋白質の作用と類似していると思われた。そこでプロ領域と既知の分子シャペロンのアミノ酸配列を比較した結果、プロ領域は分子シャペロンの一種である Hsp90ファミリーに属するタンパク質群と相同性を有していた。

④プロ領域の分子シャペロン様活性 プロ領域が、通常分子シャペロンのように、その作用のターゲットであ

る成熟毒素部分と別分子としても立体構造形成能を発揮できるかどうかを調べた。*hlyA* からプロ領域をコードする部分を切り出して発現ベクターに組み込み、プロ領域部分に相当するポリペプチド（プロペプチド）を大量発現させて精製した。成熟毒素を 6 M 塩酸グアニジンにより変性させた後、種々の濃度のプロペプチドを含む希釈液で希釈し回復した毒素を溶血活性を指標に測定した。変性処理した成熟毒素の溶血活性は単に希釈して塩酸グアニジン濃度を下げるのみではほとんど回復しなかったが、希釈液にプロペプチドを加えて希釈したところ活性はほぼ完全に回復した。

【総括】

以上のことからコレラ菌エルトル溶血毒のプロ領域は毒素自身に対するシャペロンとして機能しており、その機能はペリプラズム中での毒素の立体構造形成や分泌に必須のものであることが示唆された。またプロ領域は分子シャペロン、特に Hsp90 と相同性を有しており、恐らくそのことがプロ領域のシャペロン様活性に重要であると考えられた。更にプロ領域はプロトキシンの中で「分子内シャペロン」として機能するのみならず、成熟毒素部分と別の分子として存在させても毒素の立体構造を再構成したところから、単に分子シャペロンと構造が類似しているばかりでなく分子シャペロンと類似の機能を有しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

コレラ菌の病原因子の一つであるエルトル溶血毒はシグナルペプチドと毒素本体部分との間にプロ領域と呼ばれる領域が存在し、毒素はプロ領域と毒素本体部分からなるプロトキシンとして菌体外に分泌された後、プロ領域の切断を受けて初めて成熟毒素として機能する。本研究はプロ領域の意義を探る事を目的とし、まずプロ領域のみを特異的に欠失した変異コレラ菌を作製して溶血能を調べたところ、親株に比べ明らかに活性が低下すること、またこの株の産生する変異毒素はペリプラズム内で速やかに分解されることを明らかにした。更にエルトル溶血毒の変性-再構成実験から毒素はプロ領域がないと正しい立体構造を作れないこと、またプロ領域は分子シャペロンの一種である Hsp90 ファミリーに属するタンパク質群と高い相同性を有すること、プロ領域は一般の分子シャペロンのように毒素本体部分と別分子にしても毒素本体に対する立体構造形成作用が機能することを示し、エルトル溶血毒プロ領域は毒素本体にとって分子シャペロン様の活性を持つ「分子内シャペロン」として機能している事を明らかにした。

以上の知見は、細菌性分泌蛋白毒素の構造形成の理解に役立つのみならず、分子シャペロンの作用機構の解明に重要な手がかりを与えるものであり、学位論文に値すると考えられる。