

Title	A Mutant Toxin of <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> Thermostable Direct Hemolysin Which Has Lost Hemolytic Activity but Retains Ability To Bind to Erythrocytes
Author(s)	唐, 光慶
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/40007
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	唐 光 慶
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13003 号
学位授与年月日	平成9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	A Mutant Toxin of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Thermostable Direct Hemolysin Which Has Lost Hemolytic Activity but Retains Ability To Bind to Erythrocytes (腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の標的細胞への結合能を保持する活性低下変異毒素の解析)
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】

腸炎ビブリオの産生する耐熱性溶血毒 (TDH) は本菌の主要な病原因子と考えられている。TDH は溶血活性、細胞毒性、マウス致死活性および腸管毒性など様々な生物活性を有する。本毒素は pore-forming toxin であると考えられているが、その生物活性の発現機序についてはいまだ不明な点が多く存在している。本研究では溶血活性の低下した TDH 変異毒素を作成し、これを利用して TDH の生物活性発現機序について解析を試みた。

【方法ならびに成績】

1. 溶血活性の低下した TDH 変異毒素の作成

in vitro mutagenesis により 9 種類の TDH 変異毒素を得た。これらの変異毒素の中の一つ、R 7 は N 末端より 62 番目の glycine が serine に置換することにより、血液寒天上で溶血活性を示さないが野生型 TDH の溶血を阻害するという興味深い性質を示した。そこでさらにこの R 7 について詳しく解析を行った。

溶血活性：R 7 は野生型 TDH と比べ溶血活性が 1/1000 以下に低下していた。

膜透過性亢進作用：野生型 TDH および R 7 の膜透過性亢進作用は細胞外液中の Ca^{2+} および propidium iodide の細胞内への流入を測定することにより解析した。その結果、野生型 TDH は膜透過性亢進作用を示したが R 7 はこのような作用を示さなかった。

野生型 TDH の溶血に対する阻害：試験管内で R 7 を予め赤血球と作用させた後、野生型 TDH を作用させ溶血活性を観察した。その結果、野生型 TDH の溶血活性は 20 倍過剰量の R 7 により阻害された。

赤血球への結合能：野生型 TDH および R 7 の赤血球への結合は抗 TDH 抗体を用い enzyme immunoassay (EIA) および flow cytometry により解析した。その結果、R 7 は赤血球に対して野生型 TDH と同程度の結合を示した。

野生型 TDH の赤血球への結合に対する阻害：モノクローナル抗体 1-24 は TDH を認識し結合するが、TDH の赤血球への結合は阻害しない。そこで 1-24 を用いて野生型 TDH をラベルすることにより、TDH の赤血球への結合を flow cytometry にて解析した。その結果、R 7 は野生型 TDH の赤血球への結合に対して阻害を示した。つまり R 7 は野生型 TDH とレセプターを競合することが明らかになった。

2. 毒素の培養細胞に対する作用および変異細胞株の単離

ラット由来細胞株 Rat-1 に対し、野生型 TDH は細胞毒性および細胞膜透過性亢進作用を示したが、R 7 はこのような作用を示さなかった。また R 7 は TDH の細胞毒性に対しても阻害を示した。即ち培養細胞に対する作用は赤血球に対する作用と類似していると考えられた。そこで TDH の活性発現に関わる標的細胞側の因子の解析を目的として Rat-1 を変異原処理することにより TDH に対して耐性を示す変異細胞株 MR-T 1 を得た。

MR-T 1 への毒素の結合：TDH および R 7 を細胞と反応させ細胞に結合した毒素を可溶化し western blotting により検出した。その結果、野生型 TDH および R 7 は Rat-1 と結合できるが、両毒素のいずれも MR-T 1 とは結合できないことが明らかになった。つまり MR-T 1 に生じた変異により TDH レセプターが欠損していることが示され、この欠損により MR-T 1 は TDH に対して耐性を示すことが示唆された。

MR-T 1 と Rat-1 間の細胞融合：MR-T 1 および Rat-1 を PEG 法により細胞融合させた。得られた融合細胞は TDH に対して感受性を示した。また TDH および R 7 はこの融合細胞に結合した。即ち MR-T 1 に生じた変異は Rat-1 の genomic DNA により complementation できることが明らかになった。

【総括】

以上のことから、TDH の溶血活性および細胞毒性は二つのステップ、つまり binding および postbinding に分けられ、N 末端より 62 番目の glycine は TDH の postbinding 活性の発現に重要であることが明らかになった。また典型的な pore-forming toxins は lipid bilayer に非特異的に入り込むと考えられているが、TDH の活性発現には標的細胞側の特異的なレセプターが必須であることが明らかになった。本研究で得られた MR-T 1 を利用することにより、TDH レセプターの構造遺伝子あるいはレセプターの合成に関与する遺伝子を complementation cloning の手法で同定できる可能性が示された

論文審査の結果の要旨

腸炎ビブリオの主要な病原因子である耐熱性溶血毒 (TDH) は colloidal osmotic hemolysis を引き起こす pore-forming toxin の一種である。TDH は細胞毒性、マウス致死活性および腸管毒性も有している。

本研究では TDH の活性発現機序の解析を目的とし、溶血活性の低下した変異毒素を作成し、解析を行った。得られた変異毒素のうちの一つ、R 7 は赤血球への結合能を保持していたが N 末端から 62 番目の Gly の Ser への置換により postbinding 活性を失っていた。また R 7 は野生型 TDH と赤血球上のレセプターを競合することにより野生型 TDH の溶血を阻害した。R 7 のこのような性質は培養細胞に対しても同様であった。以上のことから Gly⁶² は TDH の postbinding 活性に重要であり、また TDH の活性発現には標的細胞上の特異的なレセプターが必須であることが明らかになった。さらに TDH の活性発現に関わる標的細胞側の因子を解析するために TDH 感受性細胞株 Rat-1 より TDH 耐性変異細胞株 MR-T 1 を単離した。MR-T 1 では recessive な変異により TDH レセプターが欠損していることが明らかになった。このことから MR-T 1 を利用することにより TDH レセプターに関与する遺伝子の complementation cloning ができる可能性が示された。

以上の知見は TDH の活性発現機序の理解に役立つのみならず、pore-forming toxin 全般の作用機構の解明にも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思われる。