The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	破傷風毒素分子の中央領域フラグメント[B]の単離精製，性状および抗-毒素免疫反応
Author(s)	雷，殿良
Citation	大阪大学，1996，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40301
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

【 26 】

氏　　名	雷（れい）　殿（でいえん）　良（りゃん）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　12659　号
学位授与年月日	平成8年7月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	**破傷風毒素分子の中央領域フラグメント[B]の単離精製，性状および抗-毒素免疫反応**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 松田 守弘 （副査） 教 授 上田 重晴　教 授 本田 武司

論 文 内 容 の 要 旨

[目　的]　破傷風毒素は分子量約15万の蛋白質で，そのN末端から[A]，[B]，[C]それぞれ分子量約5万の3つの機能的構造単位（領域）から成ることが知られている。これらのうちでフラグメント[A]（L鎖），[C]および複合フラグメント[A-B]，[B-C]（H鎖）はこれまで単離されているが，中央のフラグメント[B]は単離精製できていなかった。そこで本研究では，フラグメント[B]の単離精製を試み，それにはじめて成功したので，その物理化学的，免疫化学的性状を明らかにし，さらに抗-毒素免疫反応をその他の破傷風毒素フラグメント，毒素全分子のトキソイドのそれらと比較解析した。

[方　法]　破傷風菌（*Clostridium tetani*）Harvard A-47微研亜株を肝片加肝ブイヨンに2～3週毎に継代培養し，その4°C保存培養の一夜培養を2回繰り返したものをLatham変法培地で5～6日培養，その上清から硫安分画，超遠沈分画，ゲル濾過法（ウルトロゲルAcA34）によって精製毒素を得た。精製毒素を1 mM EDTA，30 mMシステインを含む0.1 M KNaリン酸緩衝液（pH6.5）中でパパイン：毒素（4 mg/ml反応液），1：50で25°C 16時間処理した後，HPLC（TSK G3000SWカラム，0.1 M KNaリン酸緩衝液，pH6.8）により分離し，精製フラグメント[A-B]および[C]を得た。フラグメント[A]および[B-C]は，精製毒素を100 mMジチオスレイトール(DTT)で還元(25°C 60分)，4 M尿素ですばやく処理した後，1 mM DDT，2 M尿素，1 mM DDTを含む50 mM Tris，0.6 Mグリシン緩衝液（pH8.5）で平衡化したカラム（Ultrogel AcA44またはセファデックスG-200）でゲル濾過により分離精製した。精製標品はSDS-ゲル電気泳動法で分子量，Isoelectric focusing（ファルマシアPhast System）により等電点を決定，nativeゲル電気泳動で純度を調べた。N末端アミノ酸配列は精製標品をSDS-ゲル電気泳動後PVDF膜に電気泳動的に転写して，気相Applied Biosystems Prociseシーケンサー（Perkin Elmer社，492型）によって分析した。精製フラグメント[B]のチャンネル形成能は，アゾレクチン脂質二重層に音波処理(37°C 2分)によって組み込み，パッチクランプ法によって調べた。フラグメントの抗-毒素免疫活性の検定は，ホルマリン処理した各フラグメントを$Al(OH)_3$ゲルに吸着させ，段階希釈したもの0.5 mlをddy/sマウス（各希釈段階1群10匹）に皮下注射して免疫し，4週後に100LD_{50}の毒素で攻撃して生死および症状をスコア化する方法を用い1週間にわたって記録し，平行線検定法

で行い，統計的解析をした。

［成　績］　破傷風毒素を穏やかにパパイン処理し，まずN末端側2/3のフラグメント［A-B］を単離精製し，次に精製フラグメント［A-B］をDTTで遍元して，種々の濃度の尿素で前処理した後，種々の濃度の尿素を含む緩衝液中で電気泳動し，フラグメント［B］を単離精製する至適条件を見出した。その結果，フラグメント［A-B］を100 mM DTTで還元（25°C 60分）した後，2 M尿素で処理し，2 M尿素1 mM DTTの存在下（20 mMTris-HCl，pH7.6）で，NaClの勾配（0〜0.5 M）でMono Qカラムを用いFPLCによってイオン交換クロマトグラフィーを行い，抗原特異性を指標にして，フラグメント［A］および［B］のピークを分離同定することができた。それぞれフラグメント［B］および［A］の抗原特異性を示す2つの主なピークとして得られ，それぞれ分子量48,000±2,000および54,000±2,000で，SDS-ゲル電気泳動法では1本の蛋白質バンドを示した。フラグメント［B］の等電点は7.3であった。フラグメント［B］の精製標品は，［A-B］から分子数として50〜72%の収量で得られた。精製フラグメント［B］標品のN末端アミノ酸配列はL-G-G-E-L-X(C)-I-K-I-K-Nで，毒素分子の462番目のアミノ酸Leuから始まっていた。精製フラグメント［B］は，大量（100 μg）をマウスに静脈内または筋肉内注射しても無毒であったが，人工脂質膜二重層で明確なチャンネル活動（約2.3 pS）を示した。したがって疎水性に富みチャンネル形成能をもつフラグメント［B］が，毒素の活性発現の場である細胞質内侵入に果たす役割が示唆された。

フラグメント［B］の抗-毒素免疫反応を，破傷風毒素の各種フラグメントと比較してマウス法を用いて調べたところ，フラグメント［B］は，［A］，［C］単独および［A-B］と同様，毒素全分子トキソイドに比べてはるかに低い反応を示したが，フラグメント［C］との複合体である［B-C］は，毒素全分子トキソイドと同様の用量反応曲線を示し，蛋白質量当りで比較するとそれに匹敵する防御免疫活性を示した。

［総　括］　破傷風毒素分子の中央領域フラグメント［B］の単離精製に，はじめて成功し，その諸性状を明らかにして破傷風毒素の毒作用発現段階における役割を示す結果を得た。フラグメント［B］の抗-毒素免疫反応を毒素全分子トキソイドおよびこれまで得られた種々の破傷風毒素フラグメントと比較解析したところ，フラグメント［B］単独ではその活性は低いがフラグメント［B-C］のかたちになると蛋白質量当たり毒素全分子トキソイドに相当する防御免疫活性を示した。

論文審査の結果の要旨

本研究では，破傷風の病原因子である破傷風毒素の3つの機能的構造単位（領域），［A］，［B］，［C］のうち，これまで単離精製できていなかった中央のフラグメント［B］の単離精製にはじめて成功した。そこで精製フラグメント［B］標品を用いて，フラグメント［B］の物理化学的，免疫化学的性状を明らかにし，さらに抗-毒素免疫反応を，その他のこれまで得られている破傷風毒素フラグメントのすべてと毒素全分子トキソイドのそれらと系統的に比較し，平行線検定法によって統計的に定量解析した。その結果，フラグメント［B］の物理化学的諸性状，毒素分子のもつチャンネル形成活性のフラグメント［B］における局在を明らかにし，さらにフラグメント［B］単独ではその抗-毒素反応活性は低いがフラグメント［B-C］のかたちになると，蛋白質量当りで毒素全分子トキソイドに相当する防御免疫活性をもつことを明確に示した。本研究で得られた知見は，破傷風毒素の毒作用発現段階におけるフラグメント［B］の役割の解明に基礎的知見を与えるだけでなく，破傷風予防のためのワクチンの改良に必要な重要知見を与えるものであり，学位に値すると考える。