The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	コレラ菌の産生するエルトール溶血毒のレセプターに関する研究
Author(s)	張, 東炎
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41349
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

【7】

氏　　名	張（ちょう）　東（とう）　炎（えん）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　14570　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科環境生物薬学専攻
学　位　論　文　名	**コレラ菌の産生するエルトール溶血毒のレセプターに関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　本田　武司 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　田中　慶一　　教　授　那須　正夫

論文内容の要旨

エルトール溶血毒（El Tor Hemolysin: ETH）は，*Vibrio cholerae* O1 や *Vibrio cholerae* non-O1 によって産生される細胞膜 pore 形成性毒素（pore-forming toxin）である。この毒素は標的細胞膜と結合し，毒素の oligomer 形成がおこり，標的細胞膜上に pore を形成する。これに続いて，膠質浸透圧により細胞内圧が上昇し，最終的には物理的に細胞膜を破壊（つまり溶血）すると考えられている。しかし，この破壊過程については，まだ全てが解明されているわけでない。本研究は，ETH の溶血機序の第一段階に絡むと思われる溶血毒に対する赤血球膜上のレセプターを中心として解析した。

私は，ETH の細胞膜（特に赤血球膜）上のレセプターの同定を目的としてまずヒト赤血球膜に対する 8 種の単クローン抗体を作製した。この得られたモノクローナル抗体のうち 1 つ（M_{Ab}－B1）が ETH の溶血活性を抑制したので，これを利用して ETH の赤血球膜レセプターについて解析を行った。結論として，ETH に対するヒト赤血球膜上のレセプターを glycophorin B と同定した。

まず，ヒト赤血球膜をマウスに免疫することにより，抗赤血球膜モノクローナル抗体を得，これらの内 ETH の溶血を阻害するものをスクリーニングした。得られた IgG1 単クローン抗体のうちM_{Ab}－B1 は ETH の溶血活性を濃度依存的に阻害した。赤血球をM_{Ab}－B1 で前処理後 ETH を作用させ Western blot を行った結果，赤血球膜上には ETH の Monomer と溶血をおこすのに必要な ETH の oligomer の形成が共に検出されなかった。さらに，Immunocytochemistry による解析の結果も PBS で処理した対照赤血球上には ETH が確認できたがM_{Ab}－B1 抗体で前処理した血球上では ETH は見られず，M_{Ab}－B1 は ETH と赤血球膜との結合をブロックすることが明らかになった。したがって，M_{Ab}－B1 が認識するヒト赤血球膜上の分子は ETH に対するレセプター，またはレセプターに関連する分子と考えられた。

そこでM_{Ab}－B1 が認識する分子の解析を行った。まず，この B1 抗体が認識する赤血球膜上の分子を調べるために，正常ヒト赤血球膜を用いて Western blotting で解析したところM_{Ab}－B1 はヒト赤血球膜上の46kDa 及び25kDa の 2 分子を認識した。さらに，α－chymotrypsin, pronase, proteinase K, periodate（pH4.5），periodate（pH5.5）処理により46kDa 及び25kDa 分子へのM_{Ab}－B1 の結合は消失した。しかし，trypsin 処理した赤血球膜には未処理赤血球膜と同じ46kDa と25kDa の 2 本の Band が見られた。これらの性状（その分子量や化学処理での結果）は，M_{Ab}－B1 が認識する分子は glycophorin B（ヒト赤血球膜上に存在するシアル酸含有糖蛋白質）であると推定でき

た。

そこで，M_{Ab}－B1が認識する分子を特定するためglycophorin A欠損赤血球（En（a-）型）およびglycophorin B欠損赤血球（S-s-U-）を用い，Flow cytometer（FCM）およびWestern blottingで解析した。FCMで分析すると，S-s-U-赤血球上にはM_{Ab}－B1抗体の結合は検出されず，En（a-）赤血球上には正常赤血球と同様に血球表面に結合するM_{Ab}－B1抗体が検出された。Western blottingで解析した結果，M_{Ab}－B1はglycophorin A欠損赤血球En（a-）では正常赤血球と同じく46kDa及び25kDaの2つの分子を認識したが，glycophorin B欠損赤血球S-s-U-では46kDa及び25kDaの分子を認めなかった。これらの結果から，M_{Ab}－B1モノクローナル抗体はヒト赤血球膜上のglycophorin Bを認識する事が明らかになった。したがって，glycophorin BはETHに対する赤血球膜上のレセプター（或いはレセプターに関与する分子）と考えられた。

また，ETH感受性は，En（a-）赤血球では正常赤血球と同じ程度であったが，S-s-U-赤血球では10分の1程度に感受性が低下していた。

以上の結果より，モノクローナル抗体M_{Ab}－B1が認識するヒト赤血球膜上のglycophorin Bは，ETHに対するヒト赤血球膜上のレセプターであると考えられた。さらに，完全に同じ細胞外ドメイン（N末端から26残基）を有するglycophorin AとglycophorinBの分子構造を比較して考えると，glycophorin Bの27-43番アミノ酸（細胞膜外）領域がETHの結合に重要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

Vibrio cholerae（コレラ菌）の病原因子としてコレラ毒素が有名であるが，エルトール溶血毒（ETH）も病原因子の1つと考えられている。しかし，これまでの多くの研究にも関わらずETHの活性発現の生化学的機序についてはほとんど明らかでない。そこで，本研究では，溶血作用の第1段階として重要なETHに対するヒト赤血球膜上のレセプター分子を同定することを試みた。

その結果，まず①ETHによる溶血に対して強い阻害活性を持つ，赤血球膜に対するモノクローナル抗体を作るクローン（B1）を樹立することに成功した。②このB1抗体による溶血阻害は，ETHの赤血球膜との結合阻害による事を明らかにした。また③このB1抗体が，ヒト赤血球膜上のGlycophorin Bを認識する事を明らかにした。さらに④Glycophorin B欠損赤血球は，正常赤血球と比べETHに対する感受性が低下（約1／10）していた。これらの結果から，ETHに対するヒト赤血球膜上のレセプターは，Glycophorin Bであると結論した。

これらの知見は，コレラ菌の病原性を理解する上で極めて重要なものであり，博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認められる。