The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Identification of Functional Domains of Bordetella Dermonecrotizing Toxin |
| Author(s) | 柏本, 孝茂 |
| Citation | 大阪大学, 2000, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/41814 |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【 12 】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 柏　本　孝　茂（かしもと　たかしげ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　　士（医　　学） |
| 学 位 記 番 号 | 第　15064　号 |
| 学位授与年月日 | 平成12年2月3日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科　病理系専攻 |
| 学 位 論 文 名 | Identification of Functional Domains of *Bordetella* Dermonecrotizing Toxin<br>（*Bordetella* 壊死毒の機能ドメインの同定） |
| 論 文 審 査 委 員 | （主査）<br>教　授　本田　武司<br>（副査）<br>教　授　木下タロウ　　教　授　杉本　　央 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

［目的］

*Bordetella* 壊死毒（DNT）は百日咳菌（*Bordetella pertussis*）などの *Bordetella* 属細菌に共通の病原因子である。DNTの本質はRhoファミリーの低分子量GTP結合タンパク質を特異的に脱アミド化するトランスグルタミネースであることが明らかになっている。DNTを細胞に作用させると、ストレスファイバーや細胞基質間接着斑の形成促進、DNA合成の促進、細胞の多核化等の多彩な毒素作用を示す。DNTは大腸菌のcytotoxic necrotizing factor（CNF）や *Pasteurella maltocida* 毒素（PMT）と共に新しい壊死毒ファミリーに分類される。それぞれの毒素は壊死作用という共通の生物活性を示すのみならず、一次構造においてDNTとCNFはC末端領域で、CNFとPMTはN末端領域で相同性が認められる。しかし壊死毒ファミリーの毒素の構造機能相関は良く解っていない。一般に、タンパク毒素は細胞への結合（Binding）ドメインと作用に直接関わる活性（Active）ドメインを分子内に持つA-B構造をとることが知られている。最近CNFではN末端側にBドメイン、C末端側にAドメインが局在することが報告された。本研究では壊死毒ファミリーの構造機能相関を理解するためにDNTの機能ドメインの解析を試みた。

［方法ならびに成績］

DNT遺伝子のクローニング：B.b. S798株より精製したDNTのトリプシン消化断片のN末端アミノ酸配列を基にDNAプローブを合成し、同株から作製したゲノムライブラリーをスクリーニングしてDNT遺伝子をクローニングした。DNT遺伝子の塩基配列とDNTタンパクのN末端アミノ酸配列の解析結果から、DNTのORFの開始コドンはこれまでに報告されていた位置より39bp上流のGTGである事が解った。また、*Bordetella pertussis* Tohama株のDNTを用いた解析結果も同様であった。このことから、DNTは1,464アミノ酸から成る分子量160,602のタンパクである事が明らかとなった。

酵素活性ドメインの解析：クローニングしたDNT遺伝子から部位欠失変異DNTを作製し、それぞれの酵素活性を調べて活性ドメインの局在を解析した。変異DNTの酵素活性を簡便に検出するため、大腸菌内で変異DNTとRhoAを共発現させて菌体内で作用させ、回収したRhoAの修飾を調べた。修飾を受けたRhoAはSDS電気泳動で移

動度が変化するのでこれを修飾の指標とした。この方法で種々の部位欠失変異DNTの酵素活性を認べたところ、DNTの全長を発現させたDNTwt、DNTのC端側領域のアミノ酸位523-1464のDNT断片($DNT_{523-1464}$)(数字は発現させた領域のアミノ酸位を示す)、$DNT_{1163-1464}$、$DNT_{1176-1464}$はRhoAを修飾した。一方、N末端領域断片にあたる$DNT_{1-531}$、$DNT_{1-1162}$は修飾作用を示さなかった。さらに、$DNT_{1176-1464}$のN末端側を欠失させた$DNT_{1292-1464}$、あるいはC末端側を欠失させた$DNT_{1176-1444}$、$DNT_{1176-1364}$の活性を調べたところ、いずれの変異DNTも修飾作用を示さなかった。以上の結果から、酵素活性を有するドメインはDNTのC末端側、1176a.a.からC末端まで(DNT1176-1464)の領域に局在することが解った。

トランスグルタミネースの活性中心には、システインが必須であることが知られている。活性領域を持つ$DNA_{1176-1464}$には1,305位にひとつシステインが存在している。そこで、このシステインをアラニンに置換した変異体を作製したところ、DNTの酵素活性が消失した。このシステインの近傍の一次構造には他のトランスグルタミネースと相同性が認められた。以上の事から、DNTの酵素活性領域内にある1,305位のシステインはDNTの酵素活性中心を構成していることが考えられた。

細胞への結合ドメインの解析：DNTの酵素活性ドメインを欠失したN末端断片$DNT_{1-531}$と活性ドメインを含む$DNT_{523-1464}$を作製して、それぞれが精製DNTの細胞に対する多核化を競合拮抗するかどうか調べた。その結果、DNTによる細胞の多核化は$DNT_{1-531}$によって濃度依存的に阻害された。$DNT_{523-1464}$はDNTの作用に影響しなかった。この結果とDNTの酵素活性ドメインがC末端側に局在していたという事実とを併せて、DNTのN末端から531a.a.の領域に細胞への結合あるいは細胞内移行に関するドメインが局在していると推察された。

[総括]

本研究によりDNTはこれまでの報告よりもN末端アミノ酸が13残基長いアミノ酸残基数1,464で推定分子量160,602の1本鎖タンパク毒素であることが解った。部位欠失変異DNTを用いた機能ドメインの解析から、DNTのトランスグルタミネース活性はC末端側領域1,176a.a.からC末端の領域に局在し、その活性中心は1,305位のシステインであると考えられた。一方、N末端から531a.a.の領域に細胞への結合あるいは細胞内移行に関するドメインが局在することが示唆された。以上の結果よりDNTはN末端側にBinding、C末端側にActiveドメインを持つ、B-A構造をとっていると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

*Bordetella* 壊死毒(DNT)は百日咳菌(*Bordetella pertussis*)などの *Bordetella* 属細菌に共通の病原因子である。DNTの本質はRhoファミリーの低分子量GTP結合タンパク質を標的とするトランスグルタミネースである。DNTは大腸菌のcytotoxic necrotizing factor (CNF) や *Pasteurella maltocida* 毒素 (PMT) と共に新しい壊死毒ファミリーに分類される。それぞれの毒素は壊死作用という共通の生物活性を示すのみならず、一次構造において相同性が認められる。しかし壊死毒ファミリーの毒素の構造機能相関は良く解っていない。本研究の目的は壊死毒ファミリーの構造機能相関を理解するためにDNTの機能ドメインの局在を同定することにある。DNT遺伝子のクローニングの結果から得られた塩基配列とDNTタンパクのN末端アミノ酸配列の解析から、DNTのORFの開始コドンはこれまでに報告されていた位置より39bp上流のGTGである事が明らかにした。その結果、DNTはN末端アミノ酸がこれまでの報告よりも13残基長い、アミノ酸残基数1,464、推定分子量160,602の1本鎖タンパク毒素である事が解った。部位欠失変異DNTを用いた解析から、DNTのトランスグルタミネース活性はC末端側領域1,176a.a.からC末端の領域に局在する事を明らかにし、その活性中心は1,305位のシステインであることを示唆した。また、N末端から531a.a.の領域に細胞への結合あるいは細胞内移行に関するドメインが局在することを明らかにした。以上のことからDNTはN末端側にBinding、C末端側にActiveドメインが局在するB-A構造をとることが解った。

以上の知見はDNTの毒素作用の総合的な理解に貢献しただけでなく、壊死毒ファミリー全体の構造機能相関の解明にも大いに貢献するもので、学位の授与に値すると考えられる。