



Title	Association of Pasteurella multocida Toxin with Vimentin
Author(s)	志馬, 寛明
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43879
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

氏 名	志 馬 寛 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 3 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 12 月 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	Association of <i>Pasteurella multocida</i> Toxin with Vimentin (<i>Pasteurella multocida</i> 毒素はビメンチンと結合する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 口 安 彦 (副査) 教 授 杉 本 央 教 授 本 田 武 司

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

Pasteurella multocida は、イヌ、ネコ等の哺乳動物、鳥類の口腔内や上部気道における常在菌で、咬傷や搔傷、濃密な接触によってヒトその他の動物に感染し、ときに膿瘍、肺炎、敗血症などの多種多様な病態の感染症を起こす。本菌は、分子量約 146 kDa のタンパク毒素 (PMT) を産生する。PMT は、皮内投与によって種々の動物で壊死斑を形成することから壊死毒素とも呼ばれる。また、本菌の感染によるブタの進行性萎縮性鼻炎でみられる鼻甲骨の萎縮に関与すると考えられている。培養細胞に対しては、マウス線維芽細胞 Swiss3T3 などに強力な増殖因子として働き、ラット線維芽細胞 Rat-1 では足場非依存性に増殖が誘導される。また、PMT を作用させた細胞では、三量体 G タンパク質 Gq を介したホスホリパーゼ C β の活性化や低分子量 G タンパク質 Rho の活性化がみられる。このように、PMT の生物活性は非常に多彩であるが、背景となる分子作用機構は明らかにされていない。本研究では、その作用機構を解明することを目的として、PMT と直接相互作用する細胞成分の同定を試みた。

[方法ならびに成績]

Swiss3T3 細胞の全破碎液に対し、PMT をプローブとしたリガンドオーバーレイアッセイを行ったところ、PMT 特異的に分子量約 60 kDa のタンパク質 (p60) が検出された。p60 を含むタンパクバンドを電気泳動ゲルより溶出してペプチドマスフィンガープリンティングを行った結果、そのバンドには中間径フィラメントの構成成分の一つであるビメンチン (分子量 57 kDa) が主に含まれていることが分かった。そこで、精製ビメンチンに対してリガンドオーバーレイアッセイを行ったところ、PMT はビメンチンに結合した。以上の結果から、p60 はビメンチンであることが明らかになった。さらに、PMT と精製ビメンチンを用いたプルダウンアッセイを行い、両タンパク質が溶液中でも結合することを確認した。ビメンチンは、ヘッド、ロッド、テイルの 3 つの機能ドメインから構成されており、それぞれが固有の役割を持つ。ビメンチンの欠失変異体を作製しリガンドオーバーレイアッセイを行った結果、PMT はビメンチンのヘッドドメイン (1-94 アミノ酸領域) と特異的に結合することが分かった。さらに、PMT の欠失変異体を用いた同様の解析により、PMT は 1,285 アミノ酸残基のうち 840-985 アミノ酸領域でビメンチンと結合することが明らかとなった。

[総括]

本研究では、PMT と直接結合する細胞成分として初めてビメンチンを同定した。さらに、PMT の 840-985 アミノ酸領域がビメンチンのヘッドドメイン (1-94 アミノ酸) と特異的に結合することを明らかにした。PMT は、細胞外から細胞内に侵入した後、作用を発揮すると考えられている。我々は PMT の構造活性相関についても解析を行い、PMT の C 末端側 569-1285 アミノ酸領域が細胞内活性領域であることを示唆する結果を得ている。ビメンチンとの結合領域がその領域内に存在することは、ビメンチンの局在が細胞質であることと矛盾しない。ビメンチンは、細胞の形態維持や細胞運動に関与していることや、そのヘッドドメインで多くの細胞成分と相互作用することが知られており、PMT の作用機構において補助因子の一つとして関与する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

Pasteurella multocida が産生する病原因子の一つである毒素 (PMT) は、哺乳動物細胞に強力な増殖誘導活性を示し、イノシトール三リン酸の過剰産生やアクチンストレスファイバーの過形成などの多彩な細胞応答を誘導するが、その分子作用機構は明らかにされていない。

本研究では、PMT の毒作用機構の解明を目的として、PMT と相互作用する細胞成分を探索した。その結果、毒素に感受性のある培養線維芽細胞の全タンパク質を対象としたリガンドオーバーレイ法により、PMT が 60 kDa の細胞性タンパク質 (p60) と結合することを見い出した。ペプチドマスフィンガープリント法により、p60 が中間径フィラメントの構成タンパク質の一つであるビメンチンであることを明らかにし、実際に PMT がビメンチンと結合することを示した。さらに、PMT 側の結合部位を約 150 アミノ酸残基に特定し、この領域がビメンチンのヘッドドメイン (1-94 アミノ酸残基) と結合することを示した。この研究成果により、PMT と結合する細胞成分が初めて明らかになった。

以上の結果は、PMT の作用機構を理解する上で興味深い知見を示しただけでなく、*Pasteurella multocida* の病原性の解明に大きく貢献するものであり、学位の授与に値すると考えられる。