



Title	Identification of a Receptor-Binding Domain of <i>Bordetella</i> Dermonecrotic Toxin
Author(s)	松澤, 健志
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43960
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	まつ 松澤 健志
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17357 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	Identification of a Receptor-Binding Domain of <i>Bordetella</i> Dermonecrotic Toxin (<i>Bordetella</i> 壊死毒の受容体結合ドメインの解析)
論文審査委員	(主査) 教授 堀口 安彦 (副査) 教授 目加田英輔 教授 本田 武司

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 の本質は低分子量 GTP 結合タンパク質の Rho ファミリーを特異的に脱アミド化もしくはポリアミン化するトランスクレタミネースである。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作用を示す。DNT は全長 1,464 アミノ酸残基からなる一本鎖のタンパク質毒素で、DNT の C 末端側 1,176 から 1,464 アミノ酸領域に酵素活性領域が存在する事が明らかになっている。本研究では DNT の細胞への結合に必要な最小領域を決定し、DNT と標的細胞との結合様式の解析を試みた。

[方法ならびに成績]

DNT の機能ドメインを解析するために DNT に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを 10 株作成した。各モノクローナル抗体が DNT の細胞に対する作用を阻害するかどうか調べたところ、2B3 抗体のみが DNT によるストレスファイバーの過形成作用や Rho への修飾作用、細胞の多核化作用を阻害した。また、あらかじめ細胞内に直接 2B3 抗体を微小注入しておき、その後 DNT を作用させるとストレスファイバーの過形成が観察された。2B3 抗体は細胞外では DNT の標的細胞への作用を阻害するが細胞内では DNT の作用を阻害しなかったことから、2B3 抗体が DNT と標的細胞との結合を阻害し DNT の細胞への作用を阻害していることが考えられた。2B3 抗体が認識するエピトープを調べるために種々の分子長をもつ DNT の欠失変異体を用いた western blotting 解析により調べたところ、2B3 抗体が認識するエピトープは DNT の 45-49 位アミノ酸を含むことが明らかになり、2B3 抗体が認識する DNT の N 末端側領域が DNT の標的細胞への結合に必要なことが示唆された。

DNT の標的細胞への結合に必要な最小領域を決定するため、種々の分子長をもつ DNT の欠失変異体を GST との融合タンパク質として発現させ精製した。精製した各 DNT の欠失変異体と全長 DNT を細胞の培養液に同時に添加し、全長 DNT の細胞に対する作用を拮抗的に阻害するかどうか調べた。その結果、DNT の N 末端が保存された変異体は DNT の作用をいずれも阻害することがわかった。これらの変異体のうち N 末端から 54 位アミノ酸までに相

当する DNT 断片変異体 (DNT-54) が全長 DNT の作用を競合的に阻害する最小断片であった。そこで、¹²⁵[I]ラベルした DNT1-54 を用いて結合実験を行ったところ、DNT1-54 は DNT 感受性細胞に特異的に結合し、非感受性細胞には結合しないことがわかった。さらに、2B3 抗体は DNT1-54 の細胞への結合を阻害した。以上の結果より DNT の標的細胞への結合領域が DNT の N 末端から 54 位アミノ酸領域内に存在することが明らかになり、また DNT の感受性細胞にのみ DNT が特異的に結合する分子が細胞膜表面に存在していることが示唆された。

[総括]

本研究によって、*Bordetella* 属細菌が共通して産生する DNT の標的細胞への結合領域が DNT の N 末端から 54 位アミノ酸領域中に存在することが明らかになった。また、DNT に対する細胞の感受性は、細胞膜上の特異受容体の存在に依存するものと考えられた。DNT の感受性細胞は分化能を保持した間葉系細胞が多いことから、DNT の特異受容体は分化シグナルに関わるような膜上の分子である可能性があり興味が持たれるが、いまだその分子は同定されていない。本研究において、DNT と DNT の感受性細胞との特異的な結合を検出できたことから、未分化な細胞種の細胞膜表面にのみ存在すると考えられる DNT の特異受容体を同定および解析を行う上で、DNT の標的細胞への結合領域は分子特異性の高い探索子になると思われる。

論文審査の結果の要旨

Bordetella 壊死毒 (DNT) は百日咳菌などの *Bordetella* 属細菌に共通の病原因子である。DNT の本質は低分子量 GTP 結合タンパク質の Rho ファミリータンパク質を基質とするトランスグルタミネースであり、その酵素活性領域は DNT の C 末端側の約 300 アミノ酸領域に存在する事が明らかになっている。本研究の目的は DNT の標的細胞への結合に必要な最小領域を決定し、DNT と細胞との結合様式を解析することにある。DNT の N 末端から 54 アミノ酸領域断片 (DNT1-54) が全長 DNT の作用を競合的に阻害すること、それからこの領域を認識するモノクローナル抗体が細胞外では DNT を中和するが細胞内では中和しないこと、さらに DNT1-54 を用いた細胞への結合実験の結果をあわせて、DNT の N 末端から 54 アミノ酸残基の領域に DNT の細胞への結合ドメインが存在することが明らかになった。また、DNT に対する細胞の感受性は、細胞膜上の特異受容体の存在に依存することが示唆された。DNT の感受性細胞は分化能を保持した間葉系細胞が多いことから、DNT の特異受容体は分化シグナルに関わるような膜上の分子である可能性がある。多くの細菌毒素が生化学やその他の分野において、分子特異性の高い探索子として利用されているのは周知の事実であるが、本研究によって明らかになった DNT の細胞への結合ドメインが分化に関わる特異な分子を認識する新たな探索子として利用され、発生学を始めとした細胞生物学領域に新しい研究分野を提供することも期待される。

以上の知見は細菌学にはもちろん、さらに広く細胞生物学領域の発展にも大いに貢献するものと考えられ、学位に値するものと認める。