

Title	腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の細胞毒性機構の解析
Author(s)	松田, 重輝
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47250">https://hdl.handle.net/11094/47250</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	まつ だ しげ あき 松 田 重 輝
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 1 1 0 9 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の細胞毒性機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 那須 正夫 教授 山口 明人 教授 岡部 勝

#### 論 文 内 容 の 要 旨

腸炎ビブリオは 1950 年に大阪で発生した「シラス食中毒事件」を契機に、大阪大学微生物病研究所の藤野恒三郎博士によって分離・同定された食中毒原因菌である。本菌は海洋に生息する好塩性のグラム陰性細菌であり、主として本菌の付着した海産魚介類からヒトに感染する。本菌感染症は 10-15 時間の潜伏期を経て、下痢・腹痛・発熱・嘔吐などの急性胃腸炎症状を呈する。本菌は我が国における主要な食中毒細菌であるのみならず、1996 年以降、世界的な流行を引き起こしている。

腸炎ビブリオを我妻培地(特殊な血液寒天培地)上で培養した際の溶血反応の有無は神奈川現象(KP)と呼ばれる。本菌の臨床分離株の多くが KP 陽性であるのに対し、環境分離株の多くが KP 陰性であり、本菌の病原性と KP の関連性が示されている。耐熱性溶血毒(TDH)はこの KP の原因物質として同定されたタンパク毒素である。TDH は生物活性として溶血活性、細胞毒性、腸管毒性、心臓毒性を示すこと、*tdh* 遺伝子欠損腸炎ビブリオは動物実験での病原性が低下することなどから、腸炎ビブリオの主要な病原因子と考えられている。

本研究では第一に、感染患者血清抗体に反応する腸炎ビブリオタンパク質の解析を行った。感染患者血清に反応する細菌タンパク質の解析の意義として、ワクチンや診断マーカー候補タンパク質の検索や、生体内で発現しているタンパク質の同定が挙げられる。感染患者血清に反応する腸炎ビブリオタンパク質としては TDH が報告されているのみであったので、*proteomics* 手法を用いて網羅的な解析を行うこととした。使用した患者血清は日本およびバングラディッシュから提供された 6 検体である。腸炎ビブリオの菌体タンパク質を 2 次元電気泳動で分離し、患者血清による *immunoblot* を行い、反応するスポットとして TDH と 8 つのタンパク質を同定した。また腸炎ビブリオの分泌タンパク質についても同様の解析を行い、最も強く反応するスポットとして TDH を同定した。以上の網羅的な解析により、TDH は患者血清に反応することは知られていたが、腸炎ビブリオの全タンパク質の中でも特に主要な免疫原性タンパク質であることを明らかにした。患者由来検体を用いた解析により、腸炎ビブリオのヒトへの感染における TDH の重要性が改めて示唆されたことから、以降、TDH の生物活性についての解析を行った。

これまでに TDH の生物活性については溶血活性が最も研究されており、赤血球膜上に約 2 nm の孔を形成する孔形成毒素であること、Ca<sup>2+</sup> 透過性を上昇させることが示されている。一方、TDH の培養細胞への細胞毒性については溶血作用と同様な機構が想像されており、TDH による培養細胞の Ca<sup>2+</sup> 透過性の上昇が示されているが、その標的因子も含め不明な点が多かった。TDH の細胞毒性機構の解析のため、本研究では TDH の細胞毒性を阻害する物質を

探索し、methyl-beta-cyclodextrin (MbCD) が TDH の細胞毒性を顕著に阻害することを見出した。MbCD はラフトと呼ばれる細胞膜マイクロドメインを破壊することが知られているので、TDH とラフトとの association を検討した。TDH 処理細胞を非イオン性界面活性剤である Triton X-100 にて低温処理し、スクロール密度勾配遠心によってラフトを分画した。その結果、TDH がラフトに associate していること、MbCD 処理によってラフトが破壊され、TDH のラフトへの association がなくなることを見出した。一方、TDH の 1 アミノ酸変異体であり、細胞毒性を示さないことが報告されている R7 のラフトとの association を評価したところ、TDH と異なり、R7 はラフト画分で検出されず、無毒変異体はラフトと associate しないことが示された。一方、TDH による培養細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の上昇および赤血球に対する溶血作用は、MbCD により阻害されなかった。このことから TDH はラフト非依存的に孔を形成できると考えられた。以上より、TDH の赤血球に対する溶血作用および培養細胞に対する  $\text{Ca}^{2+}$  透過性亢進作用はラフト非依存的であるのに対し、培養細胞に対する細胞毒性にはラフトへの association が必要であることが示された。

ラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールに富む細胞膜マイクロドメインであり、細胞内シグナル伝達の中継局として、また物質輸送の場として機能していると考えられている。スフィンゴ脂質の中で、スフィンゴミエリンが脂質ラフトの形成、維持に重要であることが報告されているため、TDH の細胞毒性とスフィンゴミエリンの関係について検討した。HeLa 細胞を細菌由来のスフィンゴミエリナーゼ (bSMase) で処理してスフィンゴミエリンを分解し、TDH の細胞毒性を評価したところ、bSMase の用量依存的に TDH の細胞毒性が阻害された。スフィンゴミエリンとコレステロールにより形成したリポソームによる TDH の細胞毒性に対する阻害実験、lipid overlay によるスフィンゴミエリンと TDH との direct interaction の検討の結果、TDH はスフィンゴミエリン分子を結合の標的にしているわけではないことが示された。また、SMase 処理による TDH のラフトとの association への影響を検討した。100 mU/mL の SMase で処理し、TDH と反応させた細胞では、ラフトマーカータンパク質はラフト画分より検出されたが、TDH はラフト画分より検出されなかった。このことから、TDH は本研究で使用した SMase 濃度で破壊される、SMase-sensitive なラフトと associate している可能性が考えられた。

以上より、本研究では感染患者血清を用いた網羅的な解析から TDH が腸炎ビブリオの主要な免疫原タンパク質であることを示し、腸炎ビブリオのヒトへの感染における TDH の重要性を改めて示唆した。また、TDH が培養細胞のラフトと associate することがその細胞毒性の発揮に必須であることを明らかにするとともに、多様な構造体であるラフトの中のある種のラフトのプロープとしての TDH の可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

腸炎ビブリオは我が国における主要な食中毒原因菌である。本菌の主要な病原因子として耐熱性溶血毒 (TDH) が考えられているが、その詳細な作用機構については不明であった。

申請者は腸炎ビブリオ感染患者血清抗体を用いた網羅的な解析により、TDH が主要な免疫原タンパク質であることを見出し、腸炎ビブリオのヒトへの感染における TDH の重要性を改めて示唆した。

続いて TDH の細胞毒性についての解析を行い、TDH が脂質ラフトと associate すること、脂質ラフトの破壊により TDH の脂質ラフトへの association が消失し、TDH の細胞毒性が阻害されること、TDH の無毒変異体は脂質ラフトへの association が認められないことを見出し、TDH の細胞毒性が脂質ラフト依存的であることを明らかにした。

本研究は、腸炎ビブリオの主要な病原因子である TDH の作用機構の解明に貢献する知見を提供し、学位の授与に値するものと考えられる。