

Title	Thermostable Direct Hemolysin of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Is a Bacterial Reversible Amyloid Toxin
Author(s)	福井, 貴史
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47489">https://hdl.handle.net/11094/47489</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	福 井 貴 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20952 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 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	Thermostable Direct Hemolysin of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Is a Bacterial Reversible Amyloid Toxin (腸炎ビブリオが産生する耐熱性溶血毒素はアミロイド様の性質を持つ毒素である)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 大 菌 恵 一  (副査) 教 授 杉 本 央 教 授 堀 口 安 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔 目 的 〕

腸炎ビブリオはわが国の主要な食中毒細菌として、また旅行者下痢症の起因菌のひとつとして知られている。その主要病原因子である耐熱性溶血毒素 (thermostable direct hemolysin: TDH) は 50-60°C で加熱すると活性を失うが、80°C 以上で加熱すると活性が復活する。この現象はアレニウス効果と呼ばれ、1907 年に S.A. Arrhenius によって黄色ブドウ球菌の  $\alpha$ -hemolysin で発見された。現在まで 5 菌種 6 種類の細菌毒素でアレニウス効果が報告されているが、この現象が起こる機序は解明されていなかった。一方、TDH は孔膜形成毒素といわれているが、細胞内で強制発現させた場合にも細胞死を起こすことが報告されている。つまり細胞外膜受容体を介さずとも膜障害を起こす機構があることが類推される。本研究では TDH の立体構造という点でアレニウス効果が起こる機序、及びその立体構造の変化が TDH の毒性発現とどのように関係するのかについて明らかにすることを目的とした。

#### 〔 方 法 〕

大腸菌により TDH 組み換え体を発現させ、精製し実験に供した。溶血活性はウサギ赤血球を用いて測定した。TDH の二次、及び三次構造は円偏光二色性分光法 (CD)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) により解析した。さらにゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量推定、及び透過型電子顕微鏡 (TEM) による形態観察をおこなった。またアミロイド線維の特徴であるクロス  $\beta$  ストランド構造を認識する蛍光色素チオフラビン T (ThT) を用い、TDH の線維伸長反応の反応速度定数を算出した。

#### 〔 成 績 〕

活性を持つ TDH (nativeTDH: TDHn) は 60°C の加熱により活性を持たず、 $\beta$  ストランド構造に富む構造体 (inactiveTDH: TDHi) に変化した。さらに 80°C 以上の加熱で TDH はランダムコイル状に熱変性した (unfoldedTDH: TDHu)。TDHu を急速に冷却する (-30°C/min) とその構造は TDHn となり活性を取り戻すが、緩徐に冷却した場合 (-1°C/min) は TDHi を形成し失活した。以上のことからアレニウス効果が蛋白質の構造変化

に由来することを明らかにした。

TDHn 及び TDHi のゲルろ過クロマトグラフィーを行うと TDHi は 440 kDa 以上のポイド画分に溶出されたのに対し、TDHn は 60-70 kDa 付近に溶出された。TEM による形態観察を行ったところ、TDHn は 4 つの球状粒子がリング状に会合した形態をしているのに対し、TDHi は線維状の巨大な凝集体 (長さ 43.7-234.1 nm) を形成していた。さらに 4 °C に保存した TDHi 溶液中の線維は時間とともに伸長していくことがわかった。

TDHi の FT-IR を測定するとアミロイド線維を構成する分子間  $\beta$  ストランド構造に特徴的な  $1624\text{ cm}^{-1}$  の吸収極大が観察された。同様な吸収極大は TDHn には認められなかった。ThT により線維量を測定し、線維伸長反応の反応速度定数を算出した。TDHn のみで 45 °C でタイム・ラグが観察された後に伸長反応のが観察されたのに対し、TDHn にあらかじめ TDHi を添加し 45 °C で加熱すると伸長開始までのタイム・ラグが観察されなかった。このことは核効果と呼ばれるアミロイド線維に特徴的な性質である。

ウサギ赤血球抽出脂質、及び受容体である糖脂質ガングリオシド  $\text{GT}_{1b}$  を再構成したりポソーム存在下における TDHn の CD を測定すると、TDHi に類似したスペクトルが観察された。またアミロイド結合性の色素であるコンゴ一赤を添加して TDH の溶血活性を測定すると、コンゴ一赤の濃度依存的に活性が阻害された。このことは TDH が膜脂質存在化でアミロイド線維様構造を形成し、溶血活性を発現することを示唆している。

#### [ 総 括 ]

TDH は熱凝集によりアミロイド線維様構造を形成する毒素であり、この繊維は再度高温加熱し、急速に冷却することで活性を持った立体構造へ巻き戻すことを明らかにした。そして、この現象がアレニウス効果の本態であることを示した。

### 論文審査の結果の要旨

*Vibrio parahaemolyticus* の主要病原因子である耐熱性溶血毒素 (thermostable direct hemolysin: TDH) は 50-60 °C で加熱すると活性を失うが、80 °C 以上で加熱すると活性が復活する。この現象はアレニウス効果と呼ばれ、1907 年に S.A. Arrhenius によって *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin で発見された。現在まで 5 菌種 6 種類の細菌毒素でアレニウス効果が報告されているが、この現象が起こる機序は不明であった。

本論文では TDH が熱凝集によりアミロイド線維様構造を形成する毒素であり、この線維は再度高温加熱し、急速に冷却することで活性を持った立体構造へ巻き戻すことを明らかにした。そしてその構造変化こそがアレニウス効果の本態であることを証明した。さらに標的細胞膜上で、TDH がアミロイド線維形成と類似した立体構造の変化を起こすことが溶血活性発現と関係することを示唆した。以上の結果は、細菌学上の長年の謎を解明し、詳細が不明であった TDH の溶血活性発現機構を説明し得る可能性を示した点で学位の授与に値すると考えられる。