The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Relatinoship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of Vibrio parahaemolyticus
Author(s)	大西, 紀陽久
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58087
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

【87】

氏　　名	大　西　紀陽久（おおにしきようひさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４４０９　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Relatinoship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* （腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒素における熱による線維化と溶血活性の関係）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　木村　　正 （副査） 教　授　杉本　　央　　教　授　堀口　安彦

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

耐熱性溶血毒素（thermostable direct hemolysin, TDH）と耐熱性溶血毒素関連溶血毒素（TDH-related hemolysin, TRH）は腸炎ビブリオの主要な病原因子である。TDHはその毒素活性や構造学的解析が進められているが、TRHについては詳細な構造的解析はまだなされていない。本研究では組み換えTRHタンパク質を作成して、構造科学的な解析及びTDHとの差異を調べた。

〔　方法ならびに成績　〕

大腸菌を用いた発現ベクターにより、組み換えTRHタンパク質発現系を構築して精製により確認した。分析型ゲル濾過クロマトグラフィーや超遠心分析、透過型電子顕微鏡でこのTRHは自然状態でTDHと同じように四量体を取る事が示された。

また、ヒト赤血球による溶血活性測定では各濃度で顕著な差は見られなかったが、TDHは変性後の急速冷却で活性が戻る(アレーニウス効果)のに対して、TRHは変性してしまうと活性が戻る事はなかった。そして60℃加熱における線維形成をチオフラビンTで測定すると、TDHの方がTRHよりも高い線維化が見られた。そして、CDスペクトルによってTRHの加熱変性後の折りたたみを調べると、TDHに比べてTRHはβシート構造の欠落が見られた。

〔　総　　括　〕

TDHと同じくTRHもまた溶液中で四量体構造を取る事が示された。また線維形成能の違いがあるものの溶血活性には違いがないことから、線維よりもむしろオリゴマー形成が毒性には重要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

海産物由来の腸炎ビブリオが引き起こす食中毒の主要毒素として、thermostable direct hemolysin(TDH)とTDH-related hemolysin (TRH)がある。このうちTDHは60℃付近の中温域では失活するものの、さらなる加熱により活性が元に戻るというアレニウス効果という現象が報告されている。だがもうひとつのTRHについてはまだ詳細な特徴がわかっていないため、本研究ではその解析を行った。

まず大腸菌による組み換えタンパク質発現系を用いてTRHを発現・精製し、分析ゲル濾過クロマトグラフィーと超遠心分析、透過型電子顕微鏡による解析から溶液中で4量体構造を取る事がわかった。またホモロジーモデリングから溶血に必要とされるアミノ酸はTDHとTRHでほぼ保存されていることがわかった。さらにTDHとTRHの溶血活性はほぼ同程度だが、ThTによる線維形成はTDHの方がTRHよりも高い事が示された。したがってこれら毒素の溶血現象はアミロイド線維によりもむしろ4量体による膜障害の可能性が示唆された。よって本研究は学位に値すると考えられる。