

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
青木 宏明	主査 教授 佐野 浩一 副査 教授 朝日 通雄 副査 教授 窪田 隆裕 副査 教授 樋口 和秀 副査 教授 林 秀行
主論文題名  Nanotransportation system for cholera toxin in <i>Vibrio cholerae</i> O1 ( <i>Vibrio cholerae</i> O1 菌体内におけるコレラトキシンのナノ輸送システムに関する研究)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の目的》</p> <p>コレラは <i>Vibrio cholerae</i> (<i>V. cholerae</i>)の血清型 O1と O139 が産生するコレラトキシシン(CT)により起こる下痢症である。この下痢原性毒素 CT は菌体内で産生される A サブユニット(CTA)、B サブユニット(CTB)がペリプラズムに輸送されてヘテロ6量体 CT となり、II 型分泌機構を介して菌体外へ分泌される。アルカリ性の培地で本菌を培養すると CT の産生と分泌が亢進することが明らかにされているが、CT サブユニットの菌体内産生部位からペリプラズムまでの輸送システムの存在や菌体外環境の変化による輸送システムの調節に関する知見はない。一方、<i>V. cholerae</i> と同じグラム陰性菌である <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)は CagA やウレアーゼの輸送に関わるナノ輸送システムを有しており、そのシステムは菌体外の水素イオン濃度によって調節されることが明らかにされている。</p> <p>そこで申請者は、<i>V. cholerae</i>にも <i>H. pylori</i>同様に菌体外環境によって調節される CT サブユニットのナノ輸送システムの存在と特性の一部を明らかにすることを目的とした。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>被験菌として <i>V. cholerae</i> O1 実験室株を用いた。また、抗 CT 抗体としてマウス抗 CTA モノクローナル抗体とマウス抗 CTB モノクローナル抗体、家兎抗 CTB ポリクローナル抗体を用いた。二次抗体として EIA には酵素標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を、免疫電子顕微鏡法では金標識ヤギ抗家兎 IgG 抗体と金標識ヤギ抗マウス IgM 抗体を用いた。被検菌をアルカリ性、中性、酸性の McIlvaine 緩衝液で処理した後、緩衝液中の CT 量を経時的に EIA で測定し CT 分泌量とした。また、それぞれの緩衝液に浮遊したままの菌体を超音波にて破碎の後、破碎液を5分間 10,000 Xgで遠心し、遠心上清中に含まれる CT 量を EIA で測定し CT 産生量とした。電子顕微鏡試料は、1%グルタルアルデヒドで 1 時間固定し、Lowicryl K4M に包埋した。包埋試料より作製した超薄切片上で免疫反応を行い、CT の菌体内局在部位を免疫電子顕微鏡コントラスト増強法にて解析をした。</p> <p>《結果》</p> <p>CT 産生量と分泌量について、15 分間アルカリ性の緩衝液で処理した菌体では酸性および中性の緩衝液で処理したものに比べ、産生量に差がないにも関わらず、分泌量が増加していた。これらの結果より、菌体外の pH がアルカリ性になると、菌体内 CT の輸送が加速していると推定し、CT の菌体内分布</p>	

を観察した。

酸性および中性の緩衝液で処理した菌体では、CT の存在を示す金粒子は菌体内にほぼ均一に分布していたが、10 分以上アルカリ性の緩衝液で処理したものでは、金粒子が菌体辺縁部へとシフトしている像が観察された。そこで、この現象を定量的に確認するために、Wu らの方法に準じて菌の断面を三分割し、それぞれの領域の金粒子密度を統計学的に解析した。酸性および中性の緩衝液による処理では、各領域間の金粒子分布密度に有意な差が認められないのに対して、アルカリ性の緩衝液で 10 分以上処理した場合、金粒子の分布密度が菌体辺縁部で有意に高くなることが確認された。

#### 《考 察》

申請者は、*V. cholerae* の菌体外環境をアルカリ性にするると菌体内の CT サブユニットが菌体辺縁部にシフトすることから、*V. cholerae* には菌体外の pH によって調節される CT サブユニットのナノ輸送システムが存在すると考えた。この現象は CT 産生量が増加する前の段階においても認められることから、*V. cholerae* のナノ輸送システムは毒素産生系とは異なる調節機構による毒素輸送・分泌過程の一部であると考えた。

これまでに明らかにされている *H. pylori* のナノ輸送システムは、菌体外の水素イオン濃度の上昇を細胞壁内膜分子である尿素チャネル *UreI* が感知し、*UreI* から細胞質内に何らかのシグナルが発生して作動するものである。申請者は、*V. cholerae* のナノ輸送システムは水素イオン濃度の低下によって作動する点で、*H. pylori* のそれとは異なることを明らかにした。

一般に、胃酸分泌抑制状態の個体ではコレラが重症化することが知られている。その原因として、胃酸分泌抑制状態では小腸管腔内の水素イオン濃度が低下し、ナノ輸送システムを含む CT 分泌が亢進することも考えられ、小腸管腔内の pH の制御によってコレラ発症抑制あるいはコレラ症状の軽減を図ることが出来るかもしれないと申請者は考えている。

本研究で発見した CT のナノ輸送システムは CT の分泌メカニズムに深く関係しており、今後本システムの制御系を明らかにすることにより、CT のナノ輸送システム抑制による腸粘膜機能障害の重症化予防法あるいは治療法を開発する端緒となると考えられる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	青木宏明
論文審査担当者		主 査 教授 佐 野 浩 一	
		副 査 教授 朝 日 通 雄	
		副 査 教授 窪 田 隆 裕	
		副 査 教授 樋 口 和 秀	
		副 査 教授 林 秀 行	
主論文題名			
Nanotransportation system for cholera toxin in <i>Vibrio cholerae</i> O1 ( <i>Vibrio cholerae</i> O1 菌体内におけるコレラトキシンのナノ輸送システムに関する研究)			
論文審査結果の要旨			
<p>酸性環境で病原性を発揮する <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) が菌体外の水素イオン濃度の変化によって刺激され菌体内で毒素を輸送するナノ輸送システムを有していることから、アルカリ環境で病原性を発揮する <i>Vibrio cholerae</i> (<i>V. cholerae</i>) にも類似したナノ輸送システムが存在するのではないかと申請者は考えた。しかし、コレラトキシン(CT)の産生機構やⅡ型分泌機構を介する分泌のメカニズム、あるいは、アルカリ性培地で培養するとCTの産生と分泌が亢進することなどが知られているものの、CTサブユニットの産生部位からペリプラズムへの輸送とその調節に関する知見はない。そこで、申請者は <i>V. cholerae</i> 菌体内のCT輸送システムの存在とその特性の一部を明らかにすることを目的として本研究を行っている。</p> <p>申請者は、アルカリ性、中性、酸性の緩衝液で処理した <i>V. cholerae</i> O1 実験室株のCT産生量および分泌量をEIAにて測定し、アルカリ性の緩衝液で短時間処理した菌ではCT産生量に差がないにも関わらず、分泌量が増加することを明らかにした。申請者はこれらの結果から、<i>V. cholerae</i> O1にはCTのナノ輸送システムが存在し、菌体外がアルカリ性になると、菌体内CTの輸送が加速しているのではないかと推定した。そこで菌体内のサブユニットの局在部位を免疫電子顕微鏡コントラスト増強法にて観察した。その結果、アルカリ性の緩衝液で10分以上処理した場合、CTが菌体辺縁部に偏在していることを定性的・定量的に明らかにし、<i>V. cholerae</i> O1には菌体外のpHに依存するナノ輸送システムが存在すること、さらにこのシステムは水素イオン濃度の低下によって作動する点で <i>H. pylori</i> のそれとは異なることを明らかにした。</p> <p>本研究で発見したCTのナノ輸送システムはCTの分泌メカニズムに深く関係しており、胃酸分泌抑制状態の患者においてコレラが重症化するメカニズムの一端を説明できることから、今後本システムの制御系を明らかにすることにより、CTのナノ輸送システム抑制による腸粘膜機能障害の重症化予防法あるいは治療法を開発する端緒を提供するものであると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第11条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
Medical Molecular Morphology 42: 40-46, 2009			