

氏 名	わた なべ いさ お 渡 邊 勇 夫
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2998 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	Dependence of the lethal effect of pore-forming haemolysins of gram-positive bacteria on the cytolytic activity (グラム陽性菌由来孔形成溶血毒素の細胞傷害活性に依存した致死活性の発現)
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 沢 光 昭 教 授 一 山 智 教 授 杉 田 昌 彦

論 文 内 容 の 要 旨

コレステロール依存型細胞傷害性タンパク質 (cholesterol dependent cytolysin, CDC) は、細胞表面のコレステロールに結合して細胞膜を破壊する類縁タンパク毒素の総称で、リステリア属、ストレプトコッカス属、クロストリジウム属、バシラス属などに属するグラム陽性菌により産生される。CDC は β -シートに富む 4 つのドメインから成る基本構造を有し、第 4 ドメインの C 末端付近には undcapeptide (ECTGLAWEWWR) と呼ばれる CDC に特徴的な配列が存在する。CDC はこの配列を含む領域でコレステロールに結合すると考えられており、undcapeptide は CDC の膜傷害活性に不可欠である。CDC はコレステロールに結合した後、細胞膜上で重合して膜貫通性孔を形成して細胞膜を破壊する。また、CDC はマウスに対して強い致死活性を示し、これまでに CDC に属するストレプトリシンオー (SLO)、リステリオリシンオー (LLO)、ニューモリシン (PLY) あるいはパーフリンゴリシンオー (PFO) にその活性が認められている。今のところ、これら CDC が示す致死活性は、CDC による心臓毒性によるものと考えられているが、どのような機序で CDC の膜傷害活性が心臓毒性を発揮するのかは明らかにされていない。そこで本研究では、CDC タンパク質である SLO, PLY, イバノリシンオー (ILO) や LLO, および LLO の第 4 ドメイン欠損変異体や、アミノ酸置換した組換え LLO を作製し、マウスに対する致死活性と膜傷害活性の関係について解析した。膜傷害活性は、羊赤血球に対する溶血活性で調べた。また、致死活性は、各 CDC をマウス静脈内に注射した後、マウスが死亡するまでの時間 (生存時間) を指標にして解析した。マウスに 100pmole (5.6 μ g) の LLO を静脈内注射した場合、平均の生存時間は 55 秒であった。LLO の投与量を増やすと、用量依存的に致死活性が亢進した。一方、LLO (100pmole) をコレステロール処理、あるいは 94°C で加熱処理して膜傷害活性を阻害した場合には、LLO は致死活性を示さなかった。LLO および LLO 以外の CDC の膜傷害活性を調べたところ、LLO > ILO, LLO > SLO, LLO > PLY となり、致死活性も LLO と比較して減弱していることが示された。Undcapeptide 内のアミノ酸 1 つを置換した変異体の膜傷害活性を比較すると、LLOC484S は LLO の 1/15 程度の活性しか示さなかった。また、LLOW492A の活性は著しく減弱しており、LLOW489A, LLOW491A は膜傷害活性を示さないことがわかった。これら変異体の致死活性を調べた結果、LLOC484S 投与後マウスは死亡したが、平均生存時間が 2 倍に延長することが示された。また、LLOW492A を投与した場合には、約 6 割のマウスの生存が観察された。さらに、膜傷害活性を示さない LLOW489A, LLOW491A には致死活性が認められなかった。また、第 4 ドメインを欠損した LLO415 にも膜傷害活性および致死活性は認められなかった。CDC および LLO 変異体タンパクの致死活性を膜傷害活性に対してプロットしたところ、高い相関 ($r=0.911$) が認められた。これらの結果から、CDC タンパクの致死活性は膜傷害活性に依存することが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

コレステロール依存型細胞傷害性タンパク質 (CDC) は、各種グラム陽性菌により産生される β シートに富む 4 つのド

メインから成る細胞膜傷害性毒素である。この毒素タンパク質ファミリーはマウスに強い心臓毒性による致死活性を示すことが知られているが、その分子構造と致死活性の関係は明らかではない。そこで本論文の研究では、CDC タンパク毒素ファミリーに属する異なったタンパクのリコンビナント標品や、とくに活性の強いリステリア由来 LLO の第 4 ドメイン欠損変異タンパク質、アミノ酸置換変異タンパク質などを作成し、それらの細胞膜傷害活性とマウスに対する致死活性を比較した。致死活性はそれぞれのタンパク 100pmole を尾静脈接種し、秒単位で測定した平均生存時間を指標とした。

致死活性と細胞膜傷害活性には明瞭な相関関係がみられ、とくに第 4 ドメインに保存されたウンデカペプチド領域の 1 アミノ酸変異標品では膜傷害活性と致死活性に著明な低下がみられ、第 4 ドメイン欠損変異タンパク質には全く活性がみられなかった。

以上の結果から、CDC ファミリータンパクが示すマウス致死活性は、第 4 ドメイン依存的な細胞膜傷害活性に依存することが明らかにされた。

以上の研究は細菌が産生する膜傷害性毒素タンパク質の致死活性の機構解明に貢献し、感染病態の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与者は、平成18年3月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。