

氏 名	松 崎 裕 児
(ふ り が な)	(ま つ ざ き ゆ う じ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	乙 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 7 月 8 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 名	ATP-association to intrabacterial nanotransportation system in <i>Vibrio cholerae</i> (コレラ菌のナノトランスポーターシステム への ATP の関与について)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 矢 野 貴 人 教授 小 野 富 三 人 教授 高 井 真 司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

消化器系感染症では、消化管内の pH 環境が病原細菌の定着因子や毒素の産生及び分泌に影響を与えることにより原因菌の病原性を左右している。その一つの要因である菌体内ナノ輸送システム (intrabacterial nanotransportation system; *ibNoTS*) は、菌体外環境の変化に応じて物質を菌体内で輸送する生物学的装置である。*Helicobacter pylori* は、外部からの酸刺激に反応してウレアーゼ、cytotoxin-associated gene A (CagA) や vacuolating cytotoxin A (VacA) を細胞質中央部から辺縁部へと輸送する *ibNoTS* を有している。また、*Vibrio cholerae* は、アルカリ刺激で作動するコレラトキシン (CT) の *ibNoTS* を有している。しかし、このような *ibNoTS* についてエネルギーの必要性はいまだ明らかにされていない。

V. cholerae は、アルカリ刺激で活性化されたタイプ II 分泌装置によって菌体外に CT を分泌するが、プロトノフォアにより adenosine triphosphate (ATP) 産生量が減少すると

その分泌装置によるペリプラズムから菌体外への分泌が阻害される。*ibNoTS* や分泌装置など分泌に関わる一連のシステムは、同一のエネルギー源によって作動すると考えるのが合理的であり、*ibNoTS* もエネルギー源として ATP を用いている可能性がある。

そこで本研究では、*ibNoTS* に ATP が関与しているか否かを明らかにすることを目的として、免疫電子顕微鏡法を用いて、作用機序の異なる 2 種類の ATP 合成阻害剤の CT *ibNoTS* に対する作用を検討した。

《材料と方法》

被験菌として *V. cholerae* O1 GTC2647 株を用いた。抗体は、家兎抗 CT・B サブユニット (CTB) ポリクローナル抗体、マウス抗 CTB モノクローナル抗体、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体及び金コロイド標識ヤギ抗家兎 IgG 抗体を用いた。ATP 阻害剤は、2,4-dinitrophenol (DNP) 及び 8-amino-adenosine (8-NH₂-Ado) を用いた。

DNP もしくは 8-NH₂-Ado の *V. cholerae* に対する毒性を限界希釈法で測定し、菌体内 ATP 量はルシフェラーゼ発光法により測定した。また、緩衝液中の CT 量と超音波破碎した菌体の遠心上清中に含まれる CT 量を抗原捕捉酵素免疫測定法で測定し、CT 分泌量と産生量とした。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染色を行い、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した。次に、菌体の断面を表層、中層、深層に 3 分割し、それぞれの単位面積当たりの免疫標識金粒子数を算定した。

《結 果》

60 分間 DNP 処理した菌体は、1 mM まで増殖阻害を示さなかった。DNP は、用量依存的に *V. cholerae* 菌体内の ATP 量を減少させ、1 mM DNP は ATP を DNP 未処理菌の 35.1% まで減少させた。DNP は、15 分間のアルカリ刺激で誘導される CT 分泌亢進、30 分間のアルカリ刺激による CT 産生量の増加を抑制した。次に、CT 分泌の前段階である *ibNoTS* に対する DNP の影響を免疫電子顕微鏡法により検討した結果、15 分間のアルカリ刺激によって誘導される CT の局在変化が DNP 処理により阻害された。これら一連の DNP による阻害は、ウシ血清アルブミンを含む培地による中和処理で回復した。

さらに、より特異性の高い ATP 阻害剤である 8-NH₂-Ado を用いて同様の検討をした。8-NH₂-Ado は、増殖阻害を示さない 10 mM で菌体内 ATP 量を 8-NH₂-Ado 未処理菌の 61.1% まで減少させた。この条件で前処理した菌体では、CT の分泌、産生、輸送ともに

DNP と同様の抑制を認めた。

《考 察》

DNP は、*V. cholerae* の菌体内 ATP 量を減少させると同時に、アルカリ刺激による CT の菌体辺縁部へのシフトを阻害することから、ATP 合成が減少することによって CT *ibNoTS* が阻害されると考えられた。アルカリ刺激下では、ペリプラズム内は外部環境同様のアルカリ状態となるが、細胞内膜で囲まれた菌体内は中性状態が維持されている。その状態において、プロトノフォアは細胞内膜のプロトン濃度勾配を消失させ ATP 合成を停止させるが、そのプロトン濃度勾配の消失が外部環境の変化を細胞内に伝えるシグナルに直接影響している可能性も考えられる。そこで、選択性の高い ATP 阻害剤として 8-NH₂-Ado を用いて CT *ibNoTS* への影響を検討した。アデノシン類似体 8-NH₂-Ado は、細胞内で不活性型 ATP である 8-NH₂-ATP を産生させる。この 8-NH₂-Ado 前処理によっても、DNP 同様に CT *ibNoTS* が阻害された。以上のように、2 種類の異なる機序の ATP 阻害剤によって *ibNoTS* が障害されることから、CT *ibNoTS* のエネルギー源は ATP である可能性が高いと考えられた。

《結 語》

本研究では、免疫電子顕微鏡法を用いて、機序の異なる ATP 阻害剤である DNP と 8-NH₂-Ado が *V. cholerae* の *ibNoTS* を抑制することを明らかにし、*ibNoTS* のエネルギー源は ATP であると考えた。

論文審査結果の要旨

本研究は、*Vibrio cholerae* の菌体内 ATP 量をルシフェラーゼ発光法で、コレラトキシン (CT) の分泌量と産生量を抗原捕捉酵素免疫測定法で検出し、免疫電子顕微鏡法を用いて CT の細菌内局在変化を明らかにすることによって、菌体内ナノ輸送システム (intrabacterial nanotransportation system; *ibNoTS*) に adenosine triphosphate (ATP) が関与しているか否かを明らかにしようとするものである。

本研究によって、プロトノフォアである 2,4-dinitrophenol (DNP) とアデノシン類似体である 8-amino-adenosine (8-NH₂-Ado) は、*V. cholerae* 菌体内の ATP 量を減少させ、アルカリ刺激で誘導される CT の分泌、産生、局在変化を阻害することを明らかにしている。更に、DNP による一連の阻害はウシ血清アルブミンを含む培地による中和処理で回復するとしている。この結果は、CT *ibNoTS* のエネルギー源は ATP である可能性が高いことを示すものである。

本研究の結果を含め *ibNoTS* は、エネルギー源が ATP であるという点で真核細胞の細胞内輸送システムと似通っているが、細胞骨格やモータータンパク質等の輸送に関連するタンパクにおける違いを明らかにすることによって、このシステム自体をターゲットとした治療薬の開発の道が開けるものと考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項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。

(主論文公表誌)

Medical Molecular Morphology 2015 May 19. doi: 10.1007/s00795-015-0105-4

<オンライン掲載> in press