

日本財団補助金による 2000年度日中医学学术交流促進事業

⑤. 在留中国人研究者研究助成

(9) Aeromonas, Sobriaが産生するヘモリシン受容体精製と機構解析

Aeromonas sobria が産生するヘモリシン宿主受容体の同定と性状解析

王 愛平

中国吉林省北華大学医学部付属病院 医師

日本長崎大学医学部内科学第二講座

要旨

Aeromonas sobria の産生するヘモリシンが下痢病原性に関与していることが報告されている。我々は *A. sobria* ヘモリシンの受容体として腸管由来株化細胞 Intestine 407 細胞において、p66 を同定した^①。本研究では免疫沈降法により同定した *A. sobria* ヘモリシン受容体 (p66) を分離、精製し、如何なる蛋白質であるかを明らかにしたので報告する。*Aeromonas sobria* ヘモリシンの受容体 p66 は Intestine 407 細胞を界面活性剤の Triton-X100 で可溶化した時と比べ、N-Dodecyl-beta-D-maltoside を用いた時に顕著に可溶化した。N-Dodecyl-beta-D-maltoside で可溶化した遠心上清にヘモリシンと抗ヘモリシン抗体を用いて、従来の免疫沈降法により、p66 を特異的に沈殿、分取した。そして、TCA で濃縮し、SDS-PAGE 後に p66 を Gel から抽出した。以上のように精製した受容体蛋白質を還元カルボキシメチル化後、質量分析器より解析した。得られた質量分析値を蛋白質データベースにて解析した結果、p66 は胎盤型 Alkaline phosphatase (PLAP) であることが分かった。

KEY WORDS: *A. sobria* ヘモリシン、受容体蛋白質、p66、胎盤型 Alkaline phosphatase (PLAP)

研究報告

目的：

食中毒は日本や発展している国における常見病、多発病、特に集団発生の場合大変社会問題さらに国際問題となっている。*Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* 菌種は、1982年に厚生省より食中毒菌として指定され、毎年多数の下痢症例が報告されている。この菌による下痢病原性にヘモリシン等が関与する報告がある。しかしながらヘモリシンによる下痢の詳細は明らかではありません。私たちの研究室では感染症について毒素の役割及び受容体の構造と機能を中心に研究を行っている。私の研究で、*A. sobria* 菌食中毒における下痢に関与するヘモリシン受容体は腸管細胞膜に存在する66KDa蛋白質 (P66) であることを、また糖蛋白質であることも初めて明らかにした。(Microbial Pathogenesis 1999,27,215-221)。そして、今回は、*A. sobria* 菌の受容体蛋白質 (P66) を精製し、シークエンスを明らかにして、その受容体蛋白質の構造を決定を行った。それで、*A. sobria* 菌食中毒におけるヘモリシン及びヘモリシン受容体の役割を明らかにし、下痢を予防する研究の推進を期待したいわけです。平成12年度日中医学協会の在留外国人研究助成金を受け、研究継続しているが結果として報告する。

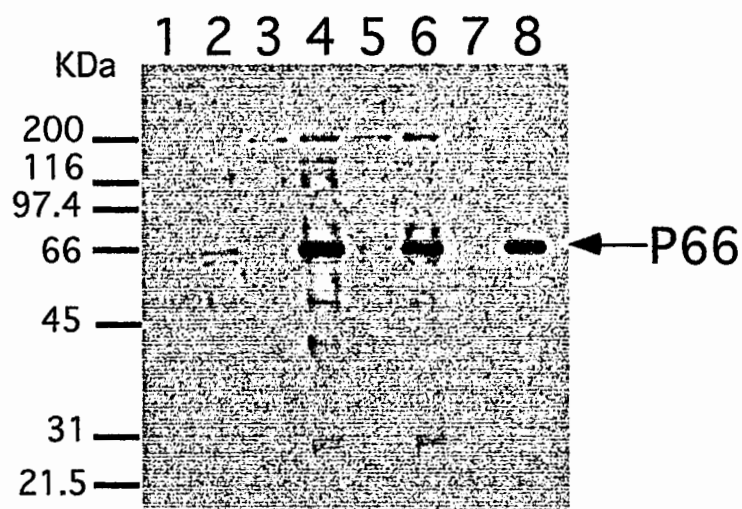
方法と結果：

1、p66の精製

(1)、可溶化物質の選択

蛋白質精製するのはまず蛋白質の可溶化する事が考えなければならない。我々は腸管由来株化細胞 Intestine 407 細胞を用いて検出したp66は膜蛋白質であるし、GPI-アンカー蛋白質である報告により、従来使用した可溶化物質Tritonx-100はGPI-アンカー蛋白質を溶かしにくいので可溶化物質の選択は精製に重要なことだと考えられる。そして、16種類の可溶化物質を初選し、さらに下記の4種類を選択して、Intestine 407 細胞を可溶化後免疫沈降法によりp66を検出した。結果としてIntestine 407 細胞を界面活性剤の Triton-X100 で可溶化した時と比べ、N-Dodecyl-beta-D-maltosideを用いた時に顕著に可溶化し、*Aeromonas sobria* ヘモリシンの受容体 p66 はよく検出できた (図1)。

図1：



レーン 1、2 TritonX-100

レーン 3、4 n-dodecyl-β-D-maltoside

レーン 5、6 n-Heptyl-β-D-thioglucoiside 30mM

レーン 7、8 n-Octyl-β-D-glucoside

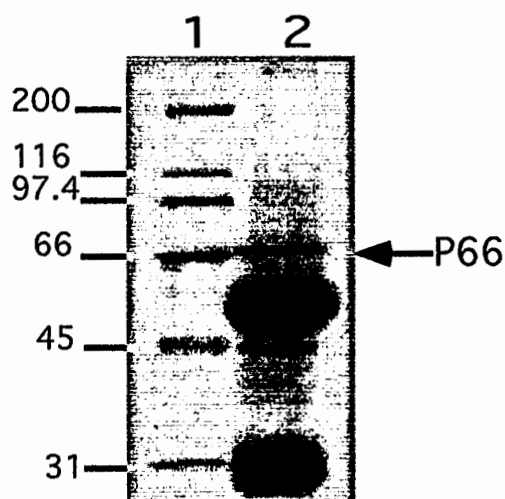
レーン 1、3、5、7 Heat-hemolysin

レーン 2、4、6、8 hemolysin

(2)、免疫複合物からp66の精製

選択したn-dodecyl-β-D-maltoside でIntestine 407 細胞を可溶化した遠心上清にヘモリシンと抗ヘモリシン 抗体 を用いて、従来の免疫沈降法により、p66を特異的に沈殿、分取した。そして、TCAで濃縮し、SDS-PAGE 後にp66をGel から抽出した。

図2：



レーン1：マーカー

レーン2：免疫複合物

2、p66のシーケンス解析

以上のように精製した受容体蛋白質を還元カルボキシメチル化後、質量分析器より解析し

た。得られた質量分析値を蛋白質データベースにて解析した結果、p66は胎盤型 Alkaline phosphatase (PLAP) であることが分かった。

考察：

われわれは *A.sobria* 菌が産生するヘモリシンが食中毒における下痢に関与する詳細を解明するために腸管細胞膜に存在するヘモリシン受容体として66KDa蛋白質 (P66) であることを初めて明らかにした。このP66は如何なる蛋白質であるかを追求する目的でIntestine 407 細胞を用いてP66を精製、それに質量分析器より解析した。結果としてp66は胎盤型 Alkaline phosphatase (PLAP) であることが分かった。ALPはオルガネラ成分や膜成分に多く含まれる。生体内での真の役割については不明の点が多い。胎盤型 ALPはアルカリフォスファターゼのアイソザイムの一つで、妊娠後期の胎盤絨毛の合胞体層 Syncytiotrophoblastに含まれ、IAPのSequenceの相同性が86.1%である。一方、小腸分泌性下痢の病態に小腸型アルカリフォスファターゼ (IAP) が重要な役割を果たしている可能性があると報告があったが③PLAPは *A.sobria* 菌の産生するヘモリシンが食中毒における下痢にどう関与するか、あるいは、PLAPは下痢を起こす正確な機序の解明が今後の課題になる。

参考文献：

① Ai-ping W, Akihiro W, Kinnosuke Y, Tomohiko N, Yoshio F, Keinoske O, Youhei M, Shigeru K, Joel M, and Toshiya H. Identification and characterization of the *Aeromonas sobria* hemolysin glycoprotein receptor on Intestine407cells. Microbial Pathogenesis 1999Oct;27(4): 215-221

② Larner J, Huang LC, Schwartz CF, Oswald AS, Shen TY, Kinter M, Tang GZ, Zeller K
Rat liver insulin mediator which stimulates pyruvate dehydrogenase phosphate contains galactosamine and D-chiroinositol. Biochem Biophys Res Commun 1988 Mar 30;151(3):1416-26

③吉岡 政洋：小腸分泌性下痢における絨毛膜 Alkaline phosphataseの役割. 日消病会誌88：1981-1989, 1984