

氏名	水野 環
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位記授与番号	博甲第 4106 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 25 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文の題目	ビブリオ・ミミカス溶血毒素の成熟過程に関与する菌体外プロテアーゼ
論文審査委員	教授 三好 伸一 教授 土屋 友房 准教授 有元 佐賀恵 准教授 黒田 照夫

### 学位論文内容の要旨

ビブリオ・ミミカス (*Vibrio mimicus*) は食中毒原因菌に指定されている病原性ビブリオの一菌種であり、その主要病原因子として溶血毒素 (VMH) があげられる。VMH は溶血活性の他、エンテロトキシン活性を有することが知られているが、その成熟過程は未だ不明な点が多い。すなわち、VMH は前駆体として産生された後、内膜通過に伴いシグナルペプチドが切断され 80 kDa の pro-VMH を生じる。その後細胞外に分泌され、プロテアーゼにより 66 kDa の成熟体へと変換されると考えられている。しかしながら、この過程に関与する酵素は未だ同定されていない。そこで、本研究では VMH の成熟過程に関与する酵素を調べるため、*V. mimicus* の分泌する細胞外プロテアーゼに着目し、検討を行った。

まず、*V. mimicus* の産生する主要な細胞外プロテアーゼである金属プロテアーゼ (VMP) が VMH の成熟過程に関与するか否かについて検討した。大腸菌の形質転換株 (*vmh*<sup>+</sup>) から精製した pro-rVMH に VMP を作用させたところ、VMP は pro-VMH を活性化するものの、得られた 66 kDa の毒素の N 末端アミノ酸配列は、成熟 VMH のそれとは異なっていた。また、作製した *vmmp* 遺伝子破壊株においても成熟 VMH の産生が確認された。したがって、VMP は VMH の成熟化に関与するプロテアーゼではないことが明らかとなった。一方、*vmmp* 遺伝子破壊株の培養上清中において、溶血活性が維持されたのに対し、野生株である ES-37 株では VMP の産生とともに溶血活性が減少し、VMH が 51 kDa へと変換された。また、精製 pro-rVMH 及び VMH は、VMP により C 末端側 15 kDa をさらに切断され、失活することが示された。この C 末端側 15 kDa のない VMH<sub>N51</sub> は VMH に比べて、赤血球膜への結合性が低下していた。したがって、VMP は VMH の赤血球膜に存在する受容体と相互作用するドメインを切断することにより、VMH を不活性化すると結論づけられる。

*vmmp* 遺伝子破壊株の培養上清中において、成熟 VMH が検出されたことから、*V. mimicus* は VMP 以外のプロテアーゼを産生することが示唆された。そこで、*vmmp* 遺伝子破壊株の培養上清中に含まれる pro-VMH を活性化する酵素の精製を行った。その結果、各種精製段階を経て、分子量 56 kDa の蛋白質が得られ、N 末端アミノ酸配列の解析結果からトリプシン様プロテアーゼであることが明らかとなった。さて、成熟 VMH は Arg<sup>151</sup>-Ser<sup>152</sup> の間で切断され生じる。そこで、この酵素の基質特異性を検討したところ、トリプシンと同様に塩基性アミノ酸残基のカルボキシル基側を強く切断した。また、培養上清中において VmtA の活性が検出されるとともに溶血活性の上昇が観察された。すなわち、VmtA が VMH の成熟過程に関与する酵素であることが強く示唆された。そこで、VmtA を pro-rVMH に作用させ、VmtA が VMH の成熟化に関与する酵素であるか否かを確認した。その結果、予想された様に、VmtA の作用により生じた 66 kDa の毒素の N 末端アミノ酸配列は、成熟 VMH のそれと一致した。すなわち、VmtA は VMH の成熟化に関与するプロテアーゼであることが証明された。

## 論文審査結果の要旨

ビブリオ・ミミカスはコレラ菌と類似した細菌であり、胃腸炎や下痢症の起因菌である。また我が国では、食中毒原因菌に指定されている。この細菌は主要な下痢毒素として溶血毒素（VMH）を産生するが、この毒素が細胞外で成熟化および不活性化される機構は不明である。本論文では、分泌性の金属プロテアーゼ（VMP）について、VMHの成熟化あるいは不活性化への関与を研究した。その結果、VMPはVMHを活性化するものの成熟化には関与しないこと、VMPはVMHの不活性化因子であることが明らかとなった。

次に、VMP遺伝子の破壊株を作製し毒素の産生を調べたところ、破壊株においてもVMHが成熟化されることが示された。そこで、VMHを成熟化する因子を同定するため、培養上精を出発材料にして、各種クロマトグラフィーを順次行った。その結果、VMHを成熟化する新規酵素として、トリプシン様のセリンプロテアーゼ（VmtA）が単離された。さらに、VmtA遺伝子のクローニングや発現時期の比較等の研究によって、このプロテアーゼがVMHの成熟化酵素であることが証明された。

以上のように、本論文はビブリオ・ミミカスの主要毒素である VMH について、成熟化と不活性化の機構を分子レベルで証明したものである。つまり、本論文に示された新規知見は、本菌感染症の発症機序を解明し有効な制御対策を確立するうえで必須である。したがって、学位論文として相応しいものであると判定した。