


医研 246

(別紙様式第3号)

論文要旨

論文題目

Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar sobria
(*Aeromonas veronii* biovar sobria のエロリジンはメタロプロテアーゼによって活性化される)

氏名 宋天燕  印

論文要旨

< 目的 > : *Aeromonas veronii* biovar *sobria* 菌は近年、感染例が増える傾向にあり、病原性についての研究が注目されている。エロモナスのプロテアーゼは間接的病原因子として推定されているが、病原機序に関する詳しい研究は少ない。エロモナスの強力な病原因子である溶血毒素（エロリジン）は前駆体のプロエロリジン（52 kDa）として菌体外に分泌され、その後 C-末領域が切断されて活性型エロリジン（47 kDa）になる。今回、我々は *A. veronii* のプロテアーゼとエロリジンの関係について検討した。

< 方法 > : 敗血症患者から分離した *A. veronii* bv *sobria* AeG1 株を用いた。培養上清からプロテアーゼ（AVP）をイオン交換カラムで精製し、N-末側のアミノ酸配列をエドマン法で決定した。プロテアーゼの種類はプロテアーゼ阻害剤による阻害効果によって判定した。AVP をコードする

論文要旨

遺伝子の塩基配列を *degenerate PCR* 及び *inverse PCR* 法を用いて決定した。培養上清の溶血活性と細胞毒性は AVP 欠損株を作製し、親株と比較してプロテアーゼの役割を判定した。抗エロリジン抗体は組換えプロエロリジンを抗原として作成し培養上清におけるエロリジン・プロエロリジンの動向をウェースタンプロットで調べた。




< 結果 > : 精製した AeG1 株のプロテアーゼ (AVP) は SDS-PAGE で分子量 34 kDa を示した。その活性はメタロプロテアーゼ阻害剤によって阻害された。遺伝子配列を決定した結果、推定 N-末アミノ酸配列はエドマン法で測定した N-末アミノ酸配列と一致した。AVP は *thermolysin* ファミリーのモチーフ領域を保有していた。AVP 欠損株のプロテアーゼ活性は親株の 44.9% まで低下し、溶血活性と細胞毒性は親株の 10% 程度まで低下した。AVP そのものは溶血活性も細胞毒性も示さなかった。培養上清を

論文要旨

ウェースタンプロット法で検査すると親株では活性型エロリジン（47 kDa）のみが検出され、欠損株ではプロエロリジン（52 kDa）が大部分を占め活性型エロリジンは微量であった。組換えプロエロリジンをAVPで処理するとエロリジンに変換され毒性が現れた。欠損株と親株の溶血活性と細胞毒性は抗エロリジン抗体によって完全に阻止された。

〈考察〉：AVPがエロリジンを活性化することが明らかになった。溶血と細胞毒性の直接的な因子はエロリジンのみであった。AVPは、強力な病原因子であるエロリジンを活性化するという、間接的かつ不可欠な病原因子であると言える。その後の経験からもAVPを大量に分泌する株はより強い病原性を示すと考えられた。

論文審査結果の要旨

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	宋 天 燕
論文審査委員	平成16年 5月27日			
	主査教授	松 崎 吾 朗		
	副査教授	小 杉 忠 誠		
	副査教授	斎 藤 厚		
(論文題目) Aerolysin is activated by metalloprotease in <i>Aeromonas veronii</i> biovar sobria				
(論文審査結果の要旨)				
<p>1. 研究の背景と目的: <i>Aeromonas veronii</i> biovar sobria (エロモナス) は、感染性下痢症や敗血症などを引き起こす病原体である。本研究は、エロモナスの病原性を解明するために、エロモナス培養上清より新しいプロテアーゼを同定し、エロモナスの溶血毒素エロリジン産生における重要性を検討した。</p> <p>2. 研究内容: ①エロモナスの分泌プロテアーゼの同定: 培養上清に大量に分泌されるプロテアーゼ (AVP) を精製し、そのN末端のアミノ酸配列を決定し、それをもとにPCR法で遺伝子の塩基配列を決定した。このAVPがメタロプロテアーゼであることが明らかとなった。②AVP欠損エロモナス作成: AVP欠損株を作成した。このAVP欠損株のプロテアーゼ活性は親株の約半分に低下し、溶血活性と細胞毒性は親株の10%程度まで低下した。一方、組換えAVPそのものは溶血活性も細胞毒性も示さなかったため、AVPが間接的に溶血活性と細胞毒性に関与すると考えられた。③AVPのプロエロリジン活性化における役割: プロエロリジンは分解されて活性型エロリジンとなり溶血活性を示す。しかし、AVP欠損株は、プロエロリジンの産生は十分に認められるものの、活性型エロリジンを微量しか産生できない。さらに、組換えプロエロリジンはAVPにより分解されて活性型エロリジンとなった。以上の結果から、AVPはプロエロリジンを活性型エロリジンに分解することにより間接的に病原性を発揮すると推定された。</p> <p>3. 研究の成果の意義と学術的水準: 本研究から、エロモナスの分泌する蛋白分解酵素AVPがプロエロリジンを分解して活性型エロリジンに変換することにより、エロモナスの溶血活性および細胞毒性が発揮されることが明らかとなった。この知見は、本病原細菌の病原性を理解するうえで重要な知見であるとともに、今後、新しい治療法あるいは予防法を開発する上で重要であると考えられる。また本研究は、蛋白構造解析、遺伝子構造解析、遺伝子欠損細菌作成、組換え蛋白作成、組換え蛋白の酵素活性決定、という分子生物学的な技術を駆使して論理的に行われた解析であり、学術的な水準も非常に高いものである。</p>				
以上の結果から、本論文は学位授与に十分値するものと判断した。				

- 備考 1 用紙の企画はA4とし縦にして左横書きとすること。
2 要旨は800~1200字以内にまとめること。
3 *印は記入しないこと。