

学 位 論 文 題 名

ボツリヌス菌 ADP-リボシル基転移酵素（C3）の
産生機構，分子性状および生物活性に関する研究

学位論文内容の要旨

ボツリヌス菌が産生する ADP-リボシル基転移酵素（C3）は，真核細胞内の分子量20,000から26,000の低分子量 GTP 結合蛋白質を基質とする。本研究では，C3の産生機構，分子性状およびその基質の機能を解析する目的で以下の実験を行った。

1) ボツリヌスC型およびD型菌のC3産生株と神経毒素産生株

ボツリヌスC型とD型菌で，どの株がC3を産生しているのかを検索した。また，神経毒素および赤血球凝集素と同様にファージの感染によりC3を産生するかどうかを調べた。

CM-Toyopearl 650M, Sephadex G-100 superfine カラムによって，ボツリヌスC型菌2株の培養上清から，C3を精製した。それら精製C3をウサギに免疫することによって抗体を作製し，その特異抗体を精製C3カラムによって精製した。それら抗体を用いた Western blotting 法によって，神経毒素産生株11株，非産生株11株の培養上清中のC3を検索した。神経毒素産生株11株と非産生株1株がC3を産生していた。

また，神経毒素非産生株に神経毒素産生株のファージを感染させると，その培養上清中にC3を産生するようになった。C3産生株がすべてファージに感染していることから，ボツリヌスC型とD型菌はファージの感染によってC3を産生することが示された。

2) C3の分子性状と酵素活性

ボツリヌスC型とD型菌の4株からの培養上清からC3を精製し，それらC3の分子性状を比較検討した。ゲル濾過と SDS-PAGE から，それらC3は単量体で分子量25,000から25,500であった。精製C3の抗原性，アミノ酸組成，アミノ末端配列から，C3は2群に分類された。ラット脳細胞膜画分を基質としたとき，すべてのC3の基質特異性は全く同じであった。しかしながら，その2種類のC3の酵素比活性は約15倍違っていた。

3) 低分子量 GTP 結合蛋白質の細胞内機能の解析

真核細胞内の低分子量 GTP 結合蛋白質を ADP-リボシル化する活性がC1型とD型神経

毒素にも報告されている。神経伝達物質放出機構にその基質の細胞内機能がかかわるのかどうかを明確にするため、D型神経毒素の毒素活性とADP-リボシル化活性の異同を各種クロマトグラフィーによって検索した。ゲル濾過とハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーで、毒素活性とADP-リボシル化活性は異なるピークとして認められ、ほとんどの毒素蛋白質は毒素活性ピークに存在しており、ADP-リボシル化活性ピーク中にはほとんど認められなかった。抗C3 IgGカラムに神経毒素をかけたとき、毒素活性と毒素分子は素通り画分にはほとんど溶出され、その画分にはADP-リボシル化活性は認められなかった。これらの結果から、神経伝達物質放出阻害機構は、基質の低分子量GTP結合蛋白質をADP-リボシル化する活性に依存しないことが明らかになった。

C3の培養細胞に対する生物活性をPC12細胞とNG108-15細胞で比較した。C3をPC12細胞の培養系に加え、二日後にその形態を観察した。最終濃度 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにC3を加えたときPC12細胞は細胞体の2倍から3倍の長さの神経突起を伸長した。同じ濃度のC3をNG108-15細胞の培養系に加えた場合、細胞体の5倍以上の長さの神経突起を伸長し、近くの細胞と接着してネットワークを形成しているように観察された。

このように、C3の基質である低分子量GTP結合蛋白質は、神経伝達物質の放出よりは、むしろ細胞分化および増殖と密接にかかわり合うことが示唆されたので、細胞分化機構を解析する有用な手段となるであろう。

学位論文審査の要旨

主査	教授	斉藤昌之
副査	教授	波岡茂郎
副査	教授	小沼操
副査	助教授	首藤文榮

細胞の増殖・分化を制御する細胞内情報伝達系に、*ras* 遺伝子産物を始めとする分子量20,000～26,000の低分子量GTP結合蛋白質(sG蛋白質)が関与することが知られている。1988年、ボツリヌス菌の産生するADP-リボシル基転移酵素(C3)が、幾種類かのsG蛋白質をADP-リボシル化しその機能を変化させることが見いだされて以来、C3はそれらsG蛋白質

の機能と作用機構を解析するプローブとして多大な関心を集めている。しかしながら、C 3 の分子性状およびそれが修飾した基質の機能変化については不明な点が多い。これらをふまえて、申請者はC 3 の産生株と産生機構を明確にした上で、C 3 を分離精製し、分子性状を調べた。また、その基質の生物活性についても検討を加えている。これらの成績をまとめた本論文は、和文48頁からなり、参考論文5編を付している。その概略は以下の通りである。

1) ボツリヌスC型菌2株の培養上清から、陽イオン交換やゲル濾過カラムを用いて、C 3 を精製し、ウサギに免疫して抗血清を作製した。この抗体を用いた Western blotting 法によって、C型およびD型菌の神経毒素産生株、非産生株それぞれ11株の培養上清を検索したところ、神経毒素産生株11株と非産生株1株がC 3 を産生していた。C 3 産生株はすべてファージに感染しており、しかも神経毒素非産生株に神経毒素産生株のファージを感染させると、C 3 を産生するようになった。従って、ボツリヌスC型とD型菌はファージの感染によってC 3 を産生することが示された。

2) ボツリヌスC型とD型菌の4株の培養上清から、それぞれC 3 を精製し、分子性状を比較検討した。ゲル濾過とSDS-PAGEでの分析によると、いずれのC 3 も単量体で分子量は25,000から25,500であった。しかし、抗原性、アミノ酸組成、N-末端アミノ酸配列の比較から、C 3 は2群に分類された。ラット脳細胞膜画分を基質として、2群のADP-リボシル化反応を比較すると、基質特異性は全く同じであったが、比活性は約15倍異なっていた。

3) 従来、C 1 型とD型の神経毒素にもsG蛋白質をADP-リボシル化する活性があると報告されており、神経伝達物質の放出機構とsG蛋白質との関係が議論されてきた。この点を明確にするために、D型神経毒素の毒素活性とADP-リボシル化活性の異同を各種クロマトグラフィーによって検索した。ゲル濾過とヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーで、毒素活性とADP-リボシル化活性は異なるピークとして認められた。C 3 に対する抗体を結合させたカラムに神経毒素をかけると、素通り画分に大部分の毒素活性が回収されたが、ADP-リボシル化活性は認められなかった。従って、従来言われていた神経毒素のADP-リボシル化活性は、標品中に混在していた微量のC 3 によるものであり、この反応と神経毒素の作用とは無関係であると結論した。一方、C 3 の培養細胞に対する作用をPC12細胞とNG108-15細胞で形態学的に比較したところ、C 3 を培養系に加えると、二日後には、PC12細胞は細胞体の2倍から3倍の長さの神経突起を伸長することが見いだされた。同じ濃度のC 3 をNG108-15細胞の培養系に加えた場合、細胞体の5倍以上の長さの神経突起を伸長した。これらの結果から、C 3 の基質であるsG蛋白質は、神経伝達物質の放出よりは、むしろ細胞の分化や増殖と密接にかかわ

り合うことが示唆されたので、C3が細胞分化機構を解析する有用な手段となることが期待される。

以上のように、本論文はC3に関して、分子性状から生物活性まで基本的かつ広範な成績を含んでおり、sG蛋白質を始めとして、細胞の増殖・分化にかかわる細胞内分子機構の解析に貢献するところが大きいと考えられる。よって、審査員一同は、申請者 森石恒司氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認める。