

「サルモネラ属菌産生毒素Stnの精製法構築及び病原性解析」

研究者名：山崎 栄樹
所属・役職：国立大学法人 帯広畜産大学
畜産衛生学研究部門 助教

共同研究者：倉園久生（帯広畜産大学）

研究分野
番号： 生物・農学系研究領域（細菌学）
研究キーワード
細菌感染症、病原因子

背景・目的

細菌感染症においては、薬剤耐性菌の出現により、従来の抗生物質投与による治療では対処できない症例が増加している。新たな治療薬の開発には分子レベルでの細菌の感染機構及び宿主障害機構を解明する事が不可欠である。細菌感染症においては多くの場合、毒素タンパク質が病態の発症に中心的な役割を果たす事が知られているが、サルモネラ属菌感染症において下痢原性を担う毒素タンパク質の同定は未だなされていない。毒素候補タンパク質 *Salmonella enterotoxin (Stn)* はサルモネラ属菌特異的に存在する事が明らかにされているものの、その下痢原性への関与は不明である。本研究ではStnの病原性を明らかにする目的で、細胞障害活性測定に必要な精製Stnの獲得系 (Stn精製法) の構築を目指した。

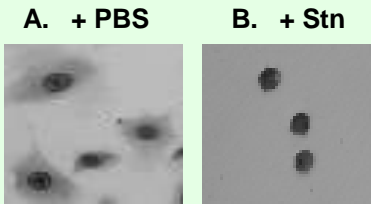
研究の成果

我々はタイの下痢患者由来の *Salmonella Enteritidis* 株 (171株) の菌体破碎上清を出発材料に硫酸アンモニウム分画及び5種類のカラムクロマトグラフィーを連続的に用いたStn精製法を構築し、更に精製Stn標品が培養細胞に対して毒性を持つ事を明らかにした (Figure 1)。しかしながら、本法においては12 Lの菌培養液を出発材料にして数μgの精製タンパク質の獲得に留まっており (Table 1)、Stnの詳細な病原性解析は困難であった。本法においては精製ステップの煩雑さが原因となり、高効率でのStnの回収が困難であったと考えられた。そこで、少ないステップでの精製系の構築を目的として、171株ゲノム上で *stn* 遺伝子末端にエピトープを導入し、171株内でStnタンパク質をtagged proteinとして発現する変異株を構築した。しかしながら、本変異株においてはStnの発現量の低さが原因となり、高濃度の精製Stn標品の獲得には至らなかった。

将来展望

サルモネラ属菌の病原因子については、その侵襲性に関与する分子群について詳細な研究が進められている一方で、下痢原性メカニズムの詳細とタンパク質毒素の本菌感染症における役割は現在でも不明である。このため、下痢症に対する治療においては現在でも対症療法が主な治療法となっている。Stnはサルモネラ属菌の腸管毒素候補物質として1994年に報告されたものの、その病原性に関しては未だ証明されていない。その原因の一つとしてStnの精製法が確立されていないことが挙げられる。我々はStn精製系の構築により精製Stnを用いた詳細な下痢発症メカニズムの解明を今後の目標としている。もしStnの下痢原性が証明されれば、得られた精製Stnを抗原として特異性の高い抗Stn抗体を獲得しStnに対する免疫学的迅速同定法の開発を行う。過去に我々はサルモネラ属菌株間でStn産生量に多様性存在する事を明らかにしており、この事と考え合わせると、Stnに対する免疫学的迅速同定法の開発により、Stn産生量、すなわち下痢原性を指標としたサルモネラ属菌感染症の診断法が開発されるものと期待している。

Figure 1 Cytotoxicity of Stn against CHO cells.



(A). CHO cells treated with PBS which served as the negative control and 87% of CHO cells (174/200) shows the natural morphology. (B). CHO cells treated with the semi-purified Stn. Stn induced cytotoxic effects on CHO cells which appeared as the disappearance of cytoplasm and the concentration of nucleus. These morphological changes in CHO cells were seen in 58% of the semi-purified Stn treated cells.

Table 1. Recovered protein-amounts through the purification steps.	
Purification Step	Recovered amount (mg)
S. Enteritidis strain 171 cell-sonicate	5,850 *
AmSO ₄ fractionation	4,690 †
Hydrophobic Interaction Chromatography	227 †
Cation Exchange Chromatography	5.00 †
Amphoteric Ion Exchange Chromatography	1.14 †
Chromatofocusing	0.341 †
Gel Filtration	0.00233 †
*Total protein amount in cell-sonicate.	
†Total protein amounts in Stn positive fractions eluted from each chromatography step.	