

論文内容要旨

報告番号	甲 総 第 13 号	氏名	後藤 月江
学位論文題目	Adsorption of Shiga Toxin to Poly- γ -Glutamate (ポリ- γ -グルタミン酸の志賀毒素吸着性)		
<p>内容要旨 和文1,000字~1,500字</p> <p>腸管出血性大腸菌(EHEC)O157:H7 は 1982 年に初めて食品媒介性病原体として認識された志賀毒素(Stx)を産生する大腸菌群の一つである。EHEC O157:H7 は免疫学的に異なる 2 種類の Stx1 と Stx2 を産生する。一般的な症状は出血性大腸炎と溶血性尿毒症症候群などであり、消化管内で生産された Stx が腸疾患と密接に関係している。Stx は人の赤血球の糖脂質に存在する P1 血液型抗原に結合すると報告され、本抗原をもつハト卵白オボムコイドは Stx1 を吸着すると報告されているが、Stx を吸着する食品に関する報告はない。多くの食品は食物繊維のような難消化性成分を含んでおり、難消化性成分が Stx を吸着するなら、Stx はその成分と共に糞便中に排出されると考えられる。</p> <p>第 1 章では、Stx を吸着する能力を指標として、難消化性成分を含む食品群について検討した。食品や食物繊維(5 mg)と 0.5%ウシ血清アルブミンを含む溶液 (100 ng/ml) 0.5 ml を混合すると、Stx1 と Stx2 の両者が発酵食品の納豆のみに吸着された。納豆はバシラス属細菌の生物学的作用によって蒸煮大豆から作られた日本の伝統食品である。納豆から Stx 吸着物質を抽出し、精製した物質は約 600 kDa の平均分子質量を示した。本物質の酸加水分解後のアミノ酸分析やプロテイナーゼ K 消化後のペプチド分析によって、Stx 吸着性物質はポリ-γ-グルタミン酸(PGA)であると同定した。精製 PGA を分画分子量 100 kDa の遠心式フィルターユニットを用いる限外ろ過法で、吸着 Stx と非吸着 Stx を分離した時には、Stx1 と Stx2 の両者を吸着すると考えられたが、Stx 吸着能をもつ PGA は上述の遠心分離の際に限外ろ過フィルター内で沈殿する不溶性型であった。飽和密度を超えて沈殿した PGA が、Stx1 と Stx2 の両者をよく吸着することを平衡透析法によって確認した。PGA は難消化性で無味無臭であるため、沈殿した PGA は Stx の除去に有用であると思われた。</p> <p>第 2 章では、化学的に不溶化した PGA の Stx 吸着性について検討した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを縮合試薬として分子間架橋した PGA と Sepharose4B で固定化した PGA を調製した。分子間架橋した PGA は平均分子質量に関係なく Stx1 および Stx2 を吸着しなかった。pH 5.0 で分子間架橋により不溶化した PGA は、飽和密度を超えて pH 7.0 で沈殿した PGA とは、表面構造が異なると考えられた。一方、PGA-Sepharose は Stx2 のみを吸着し、Stx1 は吸着しなかった。同様にグルタミン酸-Sepharose とグルタル酸-Sepharose についても、Stx2 を吸着したが Stx1 は吸着しなかった。PGA-Sepharose の Stx2 に対する解離定数(Kd)は 0.25 mM で、グルタミン酸-Sepharose とグルタル酸-Sepharose の Kd 値はほとんど同じであった(0.12 mM)。カルボキシル基を持つポリアクリル酸の Dowex Mac 3 は Stx1 と Stx2 の両方を吸着しなかった。酸性タンパク質である Stx2 は等電点が 4.1 であり、Stx2 と PGA-Sepharose の結合は PGA のカルボキシル基に対するイオンの相互作用だけではないと思われた。Stx2 は Stx1 よりも著しく高い毒性を有するが、PGA-Sepharose は Stx2 の除去に有用と考えられた。</p> <p>本研究結果は、食品成分が Stx を吸着するという最初の研究例であり、Stx 産生細菌による感染症の予防と治療に PGA が有用であることを示唆する。</p>			

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 総 第 13 号	氏 名	後藤 月江
審査委員	主 査 小山 保夫 副 査 横井川 久己男 副 査 服部 武文		
学位論文題目	Adsorption of Shiga Toxin to Poly- γ -Glutamate (ポリ- γ -グルタミン酸の志賀毒素吸着性)		
審査結果の要旨			
<p>本論文は、腸管出血性大腸菌(EHEC)O157:H7等の志賀毒素(Stx)産生病原体による感染症の予防と治療を目的として、安全な食品成分のStx吸着性を検討したものである。本病原体は、免疫学的に異なる2種類のStx (Stx1とStx2)を産生し、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群等を引き起こすため、本菌に感染した場合は死に至ることもある有害な細菌である。Stxは標的細胞表層に存在するグロボ三糖に結合することが明らかにされ、グロボ三糖を不溶性担体に固定化した吸着剤が報告されているが、安全性や吸着効率の問題から、未だ実用化には至っていない。また、人の赤血球糖脂質に存在するP1血液型抗原をもつハト卵白オボムコイドはStx1を吸着するがStx2は吸着しないと報告されている。以上のように、これまで、Stxを効果的に吸着・除去する方法は知られていない。</p> <p>多くの食品は食物繊維等の難消化性成分を含んでおり、難消化性成分がStxを吸着するなら、Stxはその成分と共に糞便中に排出されると考えられる。本論文提出者は、Stx吸着物質を安全な食品から探索し分析する研究を行った。</p> <p>第1章では、難消化性成分を含む食品並びに食物繊維についてStx吸着性を調べた。食物繊維にはStx吸着性が認められなかったが、Stx1とStx2の両者を発酵食品である納豆が吸着することを見出した。続いて、納豆からStx吸着物質を抽出・精製している。精製物質の性質と構成成分を分析したところ、Stx吸着性物質は平均分子質量約600 kDaのポリ-γ-グルタミン酸(PGA)であると同定した。さらに、Stx吸着性を示すPGAは可溶性型ではなく、不溶性型であることを見出した。PGAは難消化性で無味無臭であるため、不溶性PGAはStxの除去に有用であると示している。なお、これらの成果はJournal of Food Scienceに掲載されていることを確認した。</p> <p>第2章では、化学的に不溶化したPGAのStx吸着性について検討している。不溶性PGAとして、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを縮合試薬とする分子間架橋PGA、及びジアミノヘキサンをスペーサーとしてPGAをSephacrose4Bに固定化したPGA-セファロースを調製した。また、比較のためグルタミン酸-セファロースとグルタル酸-セファロースも調製すると共に、市販のイオン交換樹脂(DowexMac3: ポリアクリル酸)も対照として用いた。分子間架橋により不溶化したPGAはStx1およびStx2を共に吸着しないこと、PGA-セファロースはStx2のみを吸着しStx1は吸着しないこと、グルタミン酸-セファロースとグルタル酸-セファロースのStx吸着性はPGA-セファロースと同様であること、さらにDowexMac3はStx1とStx2の両者を吸着しないことを明らかにした。以上の結果から、不溶性型PGAのStx吸着性は、その特徴的な表面構造にあることを示した。なお、Stx2のみを特異的に吸着するPGA-Sephacroseは最初の報告例で</p>			

ある。

本研究結果は、食品由来成分がStxを吸着する最初の研究例であり、Stx産生細菌による感染症の予防と治療にPGAが有用であることを示唆するものであり、食品衛生学や食品微生物学の基礎領域においても、感染予防や治療の応用的観点からも、きわめて有益な知見を与えたものである。従って、本論文は総合科学教育部の博士論文として一定の水準に達するものであり、博士（学術）の学位に相当するものとする。