

Zn^{2+} と *Cl. perfringens* の α 毒素産生の関係

(予研) O 佐藤博子, 村田良介

1. 目的 ウェルシュ菌の α 毒素は、フォスホリパーゼ C として広く知られ、特に医学の領域においては、ガス壊疽症の主要な病因的役割を演じている毒素として重要視されて来た。当研究室では本毒素の産生機構解明のため合成培地を開発し、毒素産生に關与する因子の検討をおこなって来た。これまでに、 α 毒素の産生には大量のアルギニンが必要であり、シスチン、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 量の厳密な調節が重要であることが判明した。特に Zn^{2+} の添加は重要で、 Zn^{2+} の無い培地では α 毒素の産生はほとんど認められない。

今回は、 α 毒素産生における Zn^{2+} の役割をこの合成培地を用いて検討した。

2. 方法 菌株：ウェルシュ菌 PB6K. 培地：19 種のアミノ酸を含む合成培地 SM67 から Mn^{2+} のみ除いた培地 ($Zn\oplus$) と Zn^{2+} と Mn^{2+} を除いた培地 ($Zn\ominus$) を主として用いた。毒素：合成培地またはペプトン培地での培養上清から目的に応じて精製した。 α 毒素の活性：卵黄溶液を用いてフォスホリパーゼ C 活性を測定し EU (直接力価)、 L_v (間接力価) で表した。1 L_v = 10~20 EU = 30~60 LD₅₀ (マウス)。毒素タンパクの放射活性：培養上清に精製毒素および抗毒素を加え、生じた毒素・抗毒素特異沈降物中の ^{14}C -ロイシンの放射活性で表した。

3. 結果 I. α 毒素産生の kinetics

α 毒素は $Zn\oplus$ 培地では菌の発育と平行して培地中に産生され、6 時間培養でほぼ最高値に達する。一方 $Zn\ominus$ 培地では対数初期の 3~4 時間目頃に一時的にわずかに活性が見られるが、以後急速に低下して 6 時間目頃には毒素活性は消失してしまう。この $Zn\ominus$ 培地での培養途中に Zn^{2+} を添加すると毒素活性は急速に上昇し、 $Zn\oplus$ での活性と同じ値が得られる。ただし Zn^{2+} の添加が培養 4 時間以降の場合は、もはや活性の上昇は認められない。

そこでこの Zn^{2+} 添加による活性の急上昇が新たなタンパク合成を伴っているのか否かを検討した。 $Zn\oplus$ 培地での培養途中にピューロマイシンを加えると毒素産生はたちちに停止する。ところが $Zn\ominus$ 培地ではピューロマイシンで毒素産生を止めても Zn^{2+} を添加すると毒素活性は増加し、新たなタンパク合成は必要でないことを示した。

次に、 $Zn\ominus$ 培地では毒素タンパクは合成されても菌体から放出されずに菌体内に蓄積している可能性について検討した。即ち ^{14}C -ロイシンを含む $Zn\ominus$ 培地で菌体内タンパクをラベルし、集菌、洗滌後放射能の無い $Zn\oplus$ 培地で培養して産生された毒素の活性と毒素タンパク中の放射活性を経時的に測定した。その結果、毒素中にはほとんど ^{14}C -ロイシンは見られず Zn^{2+} が無いために毒素が菌体内に蓄積してしまうとは考えられない。即ち Zn^{2+} が無くても毒素タンパクは合成され、菌体外に放出されている可能性を示唆している。

^{14}C -ロイシンを含む培地での毒素産生と毒素タンパク中への ^{14}C -ロイシンの取込みを経時的に調べて見ると、 $Zn\ominus$ 培地では毒素活性がほとんど無いにもかかわらず、培養 3 時間目頃までは $Zn\oplus$ 培地での取込みと同じ値を示した。即ち $Zn\ominus$ 培地でも毒素タンパクは $Zn\oplus$

培地と同様に合成され、培地中に放出されていることが判った。

そこで $Zn\textcircled{O}$ 培地での培養上清に Zn^{2+} を添加して、 α 毒素の活性上昇が認められるのか否かを検討した結果、培養4時間目頃までの培養上清では Zn^{2+} 添加によって活性の上昇が認められた。この培養上清から活性の無い毒素タンパクの単離を試みたが、このタンパクが不安定なため未だ成功していない。

II. α 毒素と Zn^{2+} の結合および毒素活性と Zn^{2+} の関係

培地中の Zn^{2+} と毒素産生の経時的解析から、 α 毒素が Zn^{2+} と結合している可能性が示唆されたのでその点を検討した。

$^{65}ZnCl_2$ を加えた $Zn\textcircled{O}$ 培地で産生された毒素を濃縮後、セファデックス G-100 でのゲルろ過、および蔗糖の密度勾配遠心にかけて毒素活性と ^{65}Zn の放射活性を測定した。その結果、いずれの分画方法でも両活性のピークは一致した。この密度勾配遠心でのピーク部分の毒素を用いて α 抗毒素との間でゲル内沈降反応をおこなうと一本の沈降線を生じ、そのラジオオートグラフィーでは ^{65}Zn による黒化が沈降線に一致して認められた。また更にセファデックス G-100 による部分精製毒素の免疫電気泳動では α 毒素による強い沈降線が認められ、それ以外に不純物による弱い線が認められたが、ラジオオートグラフィーの結果は ^{65}Zn が毒素・抗毒素沈降物中に取込まれていることを示した。

これらの結果は α 毒素が培地中の ^{65}Zn を結合していることを示している。そこでこの結合している ^{65}Zn と α 毒素の活性発現との関係を検討した。

^{65}Zn を結合した α 毒素を EDTA に透析し、毒素活性と ^{65}Zn の放射活性を経時的に測定した。その結果、放射活性の低下に伴って毒素活性の低下が認められた。

次に ^{65}Zn を取込んだ毒素を pH 9.4 でポリアクリルアミドゲルを用いてディスク電気泳動をおこなったところ、 ^{65}Zn は毒素タンパクからはずれて色素先端に一致して移動し、毒素活性の認められる位置には全く放射活性は検出されなかった。しかし毒素を pH 9.4 で、セファデックス G-100 によるゲルろ過をおこなっても、また pH 8.0 でディスク電気泳動をおこなっても毒素活性と ^{65}Zn は分離しなかった。

このように pH 9.4 でのディスク電気泳動で ^{65}Zn がはずれても毒素タンパクが何らかの毒素活性を示したことは、 Zn^{2+} と結合していなくても毒素活性を発現し得る条件のあることを示しているのかもしれない。このことはまた、 $Zn\textcircled{O}$ 培地での培養初期にわずかな毒素活性が見られること、関連性のあることかもしれない。しかし、いずれにしてもこの点は今後更に検討を要する問題である。

以上の結果、 Zn^{2+} は本菌の毒素産生において毒素タンパクの合成には直接関係なく、合成され菌体外に放出された毒素タンパクの安定化ならびに毒素活性の発現に関与しているものと考えられる。