

*Pasteurella multocida* 毒素の作用の生細胞における観察と機能ドメインの解析○堀口安彦<sup>1</sup>、志馬寛明<sup>1</sup>、大西貴弘<sup>2</sup><sup>1</sup>阪大微研・細菌毒素、<sup>2</sup>国立衛研・微生物

*Pasteurella multocida* が産生する壊死毒 (PMT) は、1,285アミノ酸から構成される一本鎖のタンパク毒素である。PMTはホスホリパーゼCを活性化するほか、アクチンストレス線維の過形成を誘導することが知られているが、その作用機構は明らかにされていない。本研究では、PMTの毒作用を分子レベルで解明するために機能ドメインの解析を行った。PMTによるホスホリパーゼCの活性化を単一細胞で検出するために、GFPとホスホリパーゼC $\delta$ 1のPHドメインとの融合タンパク質 (GFP-PH) の安定発現細胞株を作製した。この細胞にPMTを添加すると、ホスホリパーゼCの活性化を示すGFP-PHの細胞内移行が観察された。PMTの領域特異的な抗体を細胞内に投与したところ、C末端領域 (1256-1270アミノ酸) を認識するモノクローナル抗体によってこの移行は阻害されたが、N末端領域 (2-484アミノ酸) に対するポリクローナル抗体では阻害されなかった。この結果は、アクチンストレス線維の過形成においても同様であった。一方、PMTの欠失変異体を用いてフローサイトメトリー解析を行うと、N末端断片 (1-846アミノ酸) が細胞表面に結合したが、C末端断片 (848-1285アミノ酸) は結合しなかった。また、細胞全タンパク質を対象としてリガンドオーバーレイアッセイを行った結果、PMTは840-985アミノ酸領域でビメンチンと結合することが明らかになった。以上の結果から、PMTはN末端側に細胞への結合ドメインが存在し、C末端領域は細胞内活性に関与し、さらに、中央領域でビメンチンと結合することが分かった。