

## Cytotoxic Distending Toxin B subunitの機能解析

○西久保周一、小原 勝、井倉正枝、栗原英見、菅井基行  
広島大院・医歯薬・細菌学, 歯周病態

【目的】歯周病原菌 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* は, Cytotoxic Distending Toxin (CDT) を菌体外に分泌し, 標的細胞の分裂サイクルのG2/M期停止と細胞膨化致死を引き起こす。この毒素は, 3つの蛋白(CDTA, CDTB, CDTC)より構成され, CDTB サブユニットが標的細胞内で細胞周期チェックポイント機構の活性化を誘導すると考えられている。また, CDTBサブユニットは弱いながらDnase Iとhomologyがあり, 菌種を越えてcatalytic site, metal binding siteが保存されている。これらの現象の必要条件として, 私共はCDTBサブユニットの核移行に注目し, 核膜孔通過機序の解明とCDTB サブユニットのドメインマッピングを行った。【方法】1. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* CDTBまたはGFPの融合蛋白質の細胞内注入あるいは遺伝子導入によって核移行を検討した。2. ジギトニンを用いたin vitro transport assayを試み, 核移行に必要な因子の検討を行った。3. CDTB核移行シグナルをSV40NLSに変えたキメラ蛋白質の活性について, マイクロインジェクション, プロテイントランスフェクションによって検討した。【結果および考察】免疫染色によってマイクロインジェクションしたCDTBの核局在が確認された。またPI染色でクロマチンの染色性の低下が観察された。CDTBの核移行にはATP/GTPを必要とし, CDTBはHeLa核膜孔でactive transportされることが明らかになった。各種 *cdtB* 欠失クローンをトランスフェクトした結果からCDTB核移行シグナルはN末領域に存在することが判明した。また, この領域をSV40NLSに変えたキメラ蛋白質を細胞内に導入した場合もPI染色でクロマチンの染色性の低下を認め, またプロテイントランスフェクションにより細胞膨化活性を認めた。この活性は, CDTABC複合体においても再現が可能であった。以上のことからCDTBは核移行ドメインと活性ドメインの2つのドメイン構造からなることが強く示唆された。