

## 大腸菌耐熱性エンテロトキシンの菌体外分泌に関与するTolCの機能領域

○宮野雅也、山中浩泰<sup>1</sup>、藤木博太<sup>1</sup>、岡本敬の介<sup>2</sup>

<sup>1</sup>徳島文理大・薬・生化学、<sup>2</sup>岡山大・薬・分子細胞薬品科学

毒素原性大腸菌の下痢症は、菌体外に放出されたエンテロトキシンの作用で生じる。それ故、菌体外へのエンテロトキシンの放出過程は本菌の病原性を成立させる上で必須であり、この放出過程に障害を来すと菌の病原性は消失する。このような観点から、我々は、大腸菌がいかにして活性を有する耐熱性エンテロトキシン(ST)を菌体外に放出しているのかを研究してきた。

昨年までの検討により、前駆体として生合成されたSTは内膜を通過した後、ペリプラスム内で成熟体となり、生成した成熟STは外膜蛋白質TolCの機能を介して菌体外へ放出されること、成熟STの外膜通過にはTolCのエカトリアル領域と呼ばれる部位に局在する3位および412位のLeu残基が重要であることを明らかにした。しかしながら、成熟STの外膜通過に関わるTolCの機能部位を構成アミノ酸のレベルで考えるには限界がある。そこで、成熟STの外膜通過に関わるTolCの機能部位について、さらに詳細に検討する目的で、サルモネラや腸炎ビブリオが産生するTolCをクローニングし、成熟STの外膜通過に対する機能性を大腸菌TolCの場合と比較しようと考えた。その結果、これまでに以下の知見を得た。

1. *Salmonella typhimurium* TA100株および*Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633株よりそれぞれTolC遺伝子をクローニングし、大腸菌ベクターpET11のEcoRI, HindIIIサイトに挿入した。DNA塩基配列より推定される構成アミノ酸配列を大腸菌TolCのそれと比較した結果、前者は89.5%、後者は43.3%の相同性を示した。
2. TolC遺伝子がノックアウトされた大腸菌(BL21-2株)にクローニングしたtolC遺伝子をそれぞれ導入し、それらの菌における成熟STの外膜通過効率を比較した。大腸菌TolCを発現している大腸菌が示す成熟STの外膜通過効率を100%とした場合、サルモネラTolCを発現している大腸菌では、100%近い成熟STの外膜通過効率を示したのに対し、腸炎ビブリオTolCを発現している大腸菌における成熟STの外膜通過効率は、40〜50%程度であった。この結果より、大腸菌TolCとサルモネラTolCの間では相同であるが、腸炎ビブリオTolCとの間では相同性を示さない領域が成熟STの外膜通過を引き起こす上で重要な領域であると推察した。現在、この条件を満たすいくつかの領域に注目し、キメラTolC遺伝子を作製して、それらの領域と成熟STの外膜通過との関係を明らかにすべく検討を進めている。