

*Salmonella enteritidis*の無細胞系での蛋白合成阻害因子は Chinese hamster ovary cellに細胞変性効果を示す

岩丸 祥史

An inhibitory factor for cell-free protein synthesis from *Salmonella enteritidis* exhibits cytopathic activity against Chinese hamster ovary cells

Yoshifumi IWAMARU

日本における食中毒の患者数は年間約3万人にのぼるが、その大部分は細菌性食中毒が占める。我が国の細菌性食中毒の原因菌はサルモネラ菌属が最も多く（1999年度）、中でも *S. enteritidis* は高頻度に分離されるサルモネラ菌の一血清型で、1989年以降はサルモネラ食中毒の主要な原因菌となっている。米国における食中毒患者からの *S. enteritidis* の分離率は、1980年の6%から1996年には25%になった。同様の傾向は先進国に共通してみられ、世界的に *S. enteritidis* が蔓延しつつあることを思わせる。*S. enteritidis* は急性胃腸炎を惹起するが、その病原因子は不明な点が多く、侵入性因子・エンテロトキシン・サイトトキシンの協調的関与が考えられている。また、痙攣や意識障害など中枢神経合併症の報告も散見されるが、脳症発症の機序は不明のままである。

そこで、本研究では *S. enteritidis* の感染が契機となり脳症を発症した小児から分離された菌を用いて、この菌の新たな病原因子を特定しようと試みた。細菌感染により脳症を発症する事例は、腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の合併症としてはよく知られている。そのため我々は、まずこの分離菌株がEHECの病原因子である志賀毒素（Stx）と類似する因子の産生の有無を検討した。Stxに特異的なプライマーを用いたPCR法と、抗Stxポリクローナル抗体を用いて検討したが、Stxまたは類似した因子は検出できなかった。しかし、分離菌株の菌体中に、ウサギ網状赤血球を用いた *in vitro* 蛋白合成系（cell-free蛋白合成系）に対する強い蛋白合成阻害活性が検出され、さらにChinese hamster ovary cell（CHO細胞）の細胞変性を引き起こす活性も存在することが確認された。上述のStxも同じ蛋白合成系に対して強い阻害活性を示すと共にベロ細胞に対して強い細胞活性を示

すことを考えると、我々の確認した *S. enteritidis* の蛋白合成阻害物質が、菌の病原因子として機能していることを疑わせた。次に、この *S. enteritidis* の蛋白合成阻害因子の精製を試みた。

S. enteritidis 臨床分離株の菌体を超音波処理で破碎し、超遠心分離後の上清を精製の出発材料とした。蛋白合成阻害活性は、超遠心上清に存在し、硫酸アンモニウム塩析で沈殿した。この硫酸アンモニウム画分を100、5分間処理すると蛋白合成阻害活性は消失した。cell-free蛋白合成系での阻害活性を指標として、DEAE Sephacel、Phenyl Sepharose CL-4Bを使用したクロマトグラフィー、及びRESOURCE Qを用いた高速液体クロマトグラフィーにより阻害活性を担う物質（SIPS: *Salmonella* inhibitor of protein synthesis）を精製した。得られた精製SIPSはCHO細胞の円形化と増殖阻害作用を示し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量38,000を示す、単一の蛋白から成ることが明らかになった。Superose 12を用いたゲル濾過によりSIPSは分子量82,000と推定された。このことから、非変性条件下のSIPSは二量体を形成すると考えられた。等電点電気泳動を行うことにより等電点（pI）は5.0~5.5と推定された。

精製SIPSのN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーにて決定した。得られたアミノ酸配列をデータベースに登録された配列と比較したところ、大腸菌のL-asparaginase II（E/Asp）のそれと完全に一致し、SIPSが *S. enteritidis* のasparaginaseである可能性が強く示唆された。これを確認するため、各精製段階のSIPS標品のasparaginase活性を測定した。全ての活性画分はasparaginase活性を示し、その比活性は蛋白合成阻害活性の比活性と同じく増加していた。また最終精製SIPS標

品のasparaginase比活性は市販E/Aspの比活性とほぼ一致した。

次に市販E/AspがSIPS同様に、蛋白合成阻害活性と細胞変性作用を示すか調べた。両者の蛋白合成阻害活性はほぼ同等であり、またE/AspをCHO細胞に作用させると、SIPSにより生じる形態変化と同様の形態変化をおこした。以上の結果から、SIPSが*S. enteritidis*のasparaginaseであると推論した。

種々の濃度のL-asparagineをcell-free蛋白合成系の反応液中加入すると、SIPSとE/Aspによる蛋白合成阻害は用量依存性に解除された。これはSIPS/asparaginaseが、反応液中のL-asparagineを分解することにより、蛋白合成阻害を引き起こすためと推察された。また、本研究でSIPS/asparaginaseは、CHO細胞変性作用を示すことが明らかにされたが、この作用もasparaginase活性によるものと考えられる。すなわちSIPS/asparaginase添加により培地中のasparagineが枯渇し、これによってCHO細胞は代謝阻害を起こし、形態変化と共に増殖が強

く阻害されたものと推察された。CHO細胞の増殖は培地中のasparagine濃度に大きく影響されることが報告されている。

本研究では、*S. enteritidis*の無細胞系蛋白合成阻害因子が、asparaginaseであることを初めて明らかにした。さらにこのasparaginaseが培養細胞の増殖阻害を引き起こすことも新たに見いだした。しかし、細菌の病原因子としてのasparaginaseの位置づけは、現時点では明らかではない。asparaginaseは細胞増殖が亢進した細胞に作用しその増殖を阻害することが知られ、リンパ腫などの治療に使用されているが、その副作用として脳の器質的な障害等が報告されている。実験に用いた臨床分離株は、腸炎の後に急性脳症を呈した患者から分離されており、asparaginaseが脳症を発症させる因子の一つである可能性が疑われる。実際に*S. enteritidis*の病原性にasparaginaseがどの程度関与しているかは、今後の検討課題である。