

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592140
 研究課題名（和文） 細胞周期特異的阻害因子 CDT の核内作用

研究課題名（英文） Intranuclear action of Cell cycle-specific growth inhibitory factor, CDT

研究代表者

菅井基行（SUGAI MOTOYUKI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10201568

研究成果の概要（和文）：CdtB は酵母で発現させると、致命的に作用し、S/G2 期で細胞周期を止めて細胞死を起こした。DNA 修復系遺伝子の欠損変異株を用いて CdtB の致死活性について検討した。その結果、相同組換えに関わる rad51, mre11, rad50, wrs2 欠損変異株で CdtB に対して高感受性になった。また apoptosis に関連する遺伝子欠損変異株を用いて検討した。その結果、yca1, aif1 欠損変異は CdtB 活性に影響を与えなかったことから、酵母における CdtB による致死作用は nonapoptotic であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：When CdtB was expressed in yeast, Cdt acted as cytolethal and inhibited cell cycle at S/G2. Effect of mutation of DNA repair system on CDT-induced cell death was studied. Mutants of ead51, mre11, rad50 and wrs2 were found to be highly sensitive to CdtB. Further effect of mutation of apoptotic pathway on CDT-induced cell death was studied. Mutants of yca1 and aif1 did not change their susceptibility to CdtB. These results suggest that Cdt-induced yeast cell death is not dependent on apoptosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌、CDT、細胞死、細胞周期、歯周病、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

1. 研究開始当初の背景

Aggregatibacter actinomycetemcomitans はヒトが罹患する歯周病、特に侵襲性歯周炎や慢性歯周炎の原因菌とされているグラム陰性通性嫌気性短桿菌である。本菌は他の歯周病原菌と同様に多くの病原因子を産生す

ることが知られている。歯周病原菌の多くは一般的に毒性の強いタンパク毒素は産生せずに、むしろ菌体成分である LPS やリポペプチド等の免疫系細胞や上皮細胞への直接的、間接的な炎症性サイトカインの誘導が主要な病原性発揮のメカニズムととらえられて

いるが、*A. actinomycetemcomitans*はその中
にあって数少ない強い毒性を示すタンパク
毒素を産生する歯周病原菌である。*A.*
actinomycetemcomitans が産生する主なタン
パク毒素は古典的なロイコトキシンと比較
的近年見出された Cytotolethal Distending
Toxin (CDT)である。CDT は病原大腸菌、赤痢
菌、サルモネラ菌、*Campylobacter species*,
*Helicobacter hepaticus*のような腸管病原性
細菌に見出されて来たタンパク毒素で、毒素
作用により細胞が平べったくなる
(distending) ことから、この名前がついた
殺細胞毒素である。私どもは 1998 年に *A.*
actinomycetemcomitans が CDT (Aa CDT) を
産生することを見出し、その遺伝子をクロ
ーニングし、その性状について報告して来
た (Sugai et al. Infect. Immun. 1998)。さら
に Aa CDT は *A. actinomycetemcomitans* が菌
体外に産生する細胞毒性の主体をなすこと、
ほとんどすべての臨床分離株が Aa CDT を産
生することを報告している (Yamano et al. J.
Clin. Microbiol. 2003)。Aa CDT は多くの培
養細胞に殺細胞効果を発揮し、特にリンパ球
系細胞にはアポトーシスを誘導する (Ohara
et al. Infect. Immun. 2004, Dent Japan
2004)。*A. actinomycetemcomitans* を実験的
にマウスに感染させたモデルで、リンパ球の
減少、抗体産生能の低下を認めた過去の研究
から *A. actinomycetemcomitans* には免疫能
を低下させる作用があることが古くから知
られていたが、その本態が *A.*
actinomycetemcomitans が産生する CDT であ
ることが明らかにされた。このように Aa CDT
は *A. actinomycetemcomitans* の病原性を考
える上で最も重要な病原因子の一つと言
うことができる。

CDT の作用メカニズムについては私どもを
含め多くの研究がなされてきている。CDT は

感受性細胞の細胞周期を G2/M 期に停止させ
る。CDT は CDTA, CDTB, CDTC の 3 つのサブ
ユニットから構成され、CDTA と CDTC がつくる
複合体が細胞表面の未同定のリガンドに結
合するいわゆる結合ドメインを構築し、CDTB
が毒素活性の本態をなすと考えられている。
CDTB は DNase (DNA 分解酵素) とアミノ酸配
列上の相同性を示すことから CDTB は細胞内
で核内の染色体 DNA を傷害し、細胞のチェ
ックポイント機構を発動させた後、細胞死を誘
導するという仮説が提唱されている。私ども
も CDTB はその分子内に核へ移行するため
に必須のドメインを持ち、そのドメインを使
って核内に移行することを細胞生物学的手法
を用いて明らかにした (Nishikubo et al. JBC
2003)。今までの作用メカニズム研究は大筋
で CDT の作用を明らかにしたと言えるが、根
本的な問題が残されている。その中で最も重
要なものは CDTB の核内での作用についてで
ある。なぜ CDTB が核内に入ると細胞周期チ
ェックポイント機構が発動するのか、いまだ
全く明らかにされていない。CDTB が染色体
DNA の二重鎖切断を引き起こすという仮説は
存在するが、生化学的な証明は一切なされて
いない。従って CDT の作用メカニズムの最も
核心部分がまだ未解決であるということに
なる。

2. 研究の目的

真核細胞の核内でのイベントを分子レ
ベルで解析する目的で、酵母は優れた実験モ
デルである。なぜならば、酵母には haploid 型
と diploid 型があり、目的によって両者を使
い分けることができること。網羅的な全遺伝
子の欠損変異株のライブラリーを使用する
ことができること。遺伝子操作が容易である
ことなどの利点が挙げられる。CDT の作用機
序研究に酵母が用いられた研究は 2 例あり、

酵母が CDT に感受性であることは既に報告されている。私どもは CDTB の酵母発現系を用いて以下に示す 3 つの点について研究を進める。

1) CDTB の染色体 DNA への作用の解析-過去の報告から CDTB はその内在性 DNase 活性により染色体 DNA を 2 本鎖切断すると報告されている。しかしながら、試験管内での研究では高濃度の CDT を用いても供試 DNA の 2 本鎖切断は部分的にしか観察されない。そこで haploid 系の酵母を用いて、酵母細胞の細胞周期を同調化する。細胞周期の様々な時点で CDTB を発現させ、酵母が S 期を通過出来るかどうかを検討する。もし、CDTB の作用が DNA の 2 本鎖切断であれば、haploid 酵母は S 期を通過することができない。CDTB の作用が DNA の 1 本鎖切断であるならば、S 期の通過が起こりうる可能性がある。この検討により、CDTB の核内染色体 DNA に対する作用を明らかにすることができる。

2) DNA 修復系関連タンパク質の変異株ならびにアポトーシス関連タンパク質の変異株の CDTB 感受性の検討-本研究を酵母を用いて行うことの利点の一つに、酵母では網羅的な遺伝子破壊株のライブラリーを使用出来る点にある。CDTB の酵母細胞に対する致死的な作用を増強あるいは減弱する変異株の同定は CDTB の核内での生化学的イベントを考察する上で CDTB の作用と当該遺伝子との関連性を知ることができる点で意味がある。遺伝子破壊株を用いた網羅的なスクリーニングが望ましいが、CDTB の既知の作用に鑑みて、まず DNA 修復系関連タンパク質の変異株ならびにアポトーシス関連タンパク質の変異株について焦点を絞り、これらの株における CDTB 感受性の変化を検討する。

3) CDTB の核内タンパク複合体との相互作用に関する検討-CDTB の核内での作用が核内の

タンパク質との相互作用の上で発揮されるという可能性は、CDTB の *in vitro* での極めて弱い DNase 活性からも否定することができない。そこで酵母内で大量に発現させた不活型 CDTB を用いて、CDTB と相互作用するタンパク群の同定を検討する。

3. 研究の方法

1) CDTB の染色体 DNA への作用の解析

CDTB はその内在性 DNase 活性により染色体 DNA を 2 本鎖切断すると報告されている。しかしながら、試験管内での研究では高濃度の CDT を用いても供試 DNA の 2 本鎖切断は部分的にしか観察されない。そこで haploid 系の酵母として *Schizosaccharomyces pombe* を用いて実験を行った。*S. pombe* の細胞周期を同調化させるために nonodazole, alpha-factor を用いている。Nocodazole は細胞周期を G2 期に停止させることができる。また alpha-factor は細胞周期を G1 期に停止させることができる。これらの阻害剤を除去して、細胞周期を進行させた後、様々な時点で CDTB を発現させ、酵母が S 期を通過出来るかどうかを検討した。*S. pombe* の細胞周期の算定は FACStar を用いて行った。

2) DNA 修復系関連タンパク質の変異ならびにアポトーシス関連タンパク質の変異株の CDTB 感受性の検討

DNA 修復系関連タンパク質の変異株ならびにアポトーシス関連タンパク質の変異株について焦点を絞り、これらの株における CDTB 感受性の変化を検討した。DNA 修復系としては TEL1, rad50, rad51, rad53, CDK1, MEC1, MRE11, XRS2, SWR1, BDF1。アポトーシス関連タンパク質としては Aif, YCA1, DRP1, FIS1, Ste20 等を

検討した。酵母では網羅的な遺伝子破壊株のライブラリーは Gerald R. Fink 博士より分与されたものを使用した。CDTB 遺伝子はマルチコピープラスミド (GAL1 promoter) を用いて発現させ、その程度はガラクトースの濃度により調節する。本研究はタイ王国 Chulalongcorn 大の Oranart Matangkasombut 博士との共同研究で行った (研究協力者)。

3) CDTB の核内タンパク複合体との相互作用に関する検討

CDTB の核内での作用が核内のタンパク質との相互作用の上で発揮されるという可能性は、CDTB の *in vitro* での極めて弱い DNase 活性からも否定することができない。そこで酵母内で大量に発現させた不活型 CDTB を用いて、CDTB と相互作用するタンパク群の同定を検討する。CDTB の H273 に変異を導入した不活型の CDTB 遺伝子を *S. pombe* 内で強発現させたのち、菌体を回収し、菌体を緩やかに破砕して、核画分を得る。核画分はさらに、ビーズビーターを用いて核膜を破砕し、核タンパク画分を調整する。CDTB にはあらかじめ N 末端あるいは C 末端に His タグあるいは TAP tag を付与しておく。Tag を用いて CDTB および CDTB と相互作用するタンパク質を精製する。CDTB をベイトにして共に精製されたタンパク質については一次元 SDS 電気泳動後にゲルを切り出し、TOF-MS 解析を行って、タンパク質を同定する。

4. 研究成果

A. *actinomycescomitans* CdtB は酵母で発現させると、酵母に致死的に作用し、酵母は S/G2 期で細胞周期を止めて細胞死を起こした。この細胞死は CdtB の DNase

活性に関与すると考えられている必須アミノ酸の変異により、阻害され、また動物細胞で核内移行に必要と考えられた CdtB のドメインを必要とした。従って haploid においても、CdtB が diploid と同様なメカニズムによって作用すると考えられた。CdtB の DNase 活性が、毒素作用の本態とすると、DNA 傷害が致死作用の引き金になる可能性がある。そこで、DNA 修復系遺伝子の欠損変異株を用いて CdtB の致死活性に及ぼす影響について検討した。その結果、相同組換えに関わる *rad51*, *mre11*, *rad50*, *wrs2* 欠損変異株で CdtB に対して高感受性になることが明らかとなった。また apoptosis に関連する遺伝子欠損変異株を用いて CdtB の作用が apoptosis であるかどうかについて検討した。その結果、*yca1*, *aif1* 欠損変異は CdtB 活性に影響を与えなかったことから、酵母における CdtB による致死作用は nonapoptotic であると考えられた。またアポトーシスに関連して、以前に CDT が MOLT-4 や Jurkat といった T 細胞白血病細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにしたが、カスパーズの阻害剤 *z-VAD-fmk* を用いて、アポトーシスを阻害しても、細胞死を完全には阻害できないことを見いだした。さらに *z-VAD-fmk* 処理 MOLT-4 細胞では CDT 処理によって細胞内反応性酸素レベルが上がる事を見いだした。この現象はアポトーシスの誘導と正反対の事象である。さらに MOLT-4 に *Bcl2* の過剰発現を誘導すると、この細胞に CDT を作用させた場合、*z-VAD-fmk* の存在下でアポトーシスの誘導が完全に抑制された。以上のことから、CDT は MOLT-4 や Jurkat に早期のアポトーシスを誘導するとともに、後期には非アポトーシス性の細胞死を誘導する事を

見いだした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Masaru Ohara, Mutsumi Miyauchi, Keiko Tsuruda, Takashi Takata, Motoyuki Sugai. Topical application of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* CDT induces cell cycle arrest in the rat gingival epithelium *in vivo*. *Journal of Periodontal Research* 46, 389-395, 2011 (査読あり) .

2. Oranart Matangkasombut, Roongtiwa Wattanawaraporn, Keiko Tsuruda, Masaru Ohara, Motoyuki Sugai, Skorn Mongkolsuk. Cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces DNA damage, S/G2 cell cycle arrest and caspase-independent death in budding yeast model. *Infection and Immunity* 78: 783-792, 2010 (査読あり) .

3. Toth I, Nougayrede JP, Dobrindt U, Ledger TN, Boury M, Morabito S, Fujiwara T, Sugai M, Hacker J, Oswald E. Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 77 (1): 492-500, 2009 (査読あり) .

4. Ohara, M., Hayashi, T., Kusunoki, Y., Nakachi, K., Fujiwara, T., Komatsuzawa, H., Sugai, M. Cytolethal distending toxin induces caspase-dependent and -independent cell death in MOLT-4 and Jurkat cells. *Infection and Immunity* 76(10):4783-4791, 2008 (査読あり) .

[学会発表] (計 1 件)

1. Matangkasombut, O., Wattanawaraporn, R., Tsuruda, K., Ohara, M., Sugai, M., Mongkolsuk, S. Cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces

DNA damage, S/G2 cell cycle arrest and caspase-independent death in budding yeast model. 3rd Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, Hiroshima, Nov 7-8, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅井基行 (SUGAI MOTOYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 10201568

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

()