

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580379

研究課題名（和文）ガス壊疽菌産生壊死毒素による急性心原性ショックの病態生理機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of pathophysiologic mechanisms of acute cardiogenic shock by necrotizing toxins from gas gangrene bacilli.

研究代表者

向本 雅郁（MUKAMOTO MASAFUMI）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：80231629

研究成果の概要（和文）：自立拍動するラット心筋細胞の $\alpha$ 毒素による拍動停止は細胞膜に $\alpha$ 毒素が孔を形成した結果、細胞質内 $\text{Ca}^{2+}$ の過剰によるミトコンドリア障害からのATP産生の低下やATPの枯渇によることが明らかとなった。細胞膜への $\alpha$ 毒素の結合および細胞致死活性には338および342番目のトリプトファン、340番目の疎水性アミノ酸、339番目の負電荷アミノ酸の存在が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Contraction of cultured cardiomyocytes from rat fetus heart ventricles have been stopped by pore formation of alpha-toxin on cell membranes. It was suggested that decrease of ATP productions and desiccation of ATP in cardiomyocytes have been caused by mitochondrial myopathy from  $\text{Ca}^{2+}$  excess in cytoplasm. It has been clear that tryptophan of 338th and 342th, hydrophobic amino acids of 340th and negative charged amino acids of 339th play an important roles in cell binding and cytotoxic activities of alpha-toxin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：獣医感染症学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：悪性水腫、クロストリジウム、細胞壊死毒素、心臓、心不全、セプチカム

## 1. 研究開始当初の背景

ガス壊疽は *Clostridium* 属のガス壊疽菌群によって引き起こされる致死性の高い人獣

共通感染症である。ガス壊疽菌は皮膚や腸管の創傷部位から感染し、血行が遮断され、嫌気的条件下の成立した創傷部深部で増殖して

筋肉組織や皮下組織へと病巣が拡大する。多種の毒素・酵素を産生し、組織壊死やガス形成、さらには毒血症を引き起こす。家畜の悪性水腫の原因菌である *C. septicum* が産生する主要な病原因子である  $\alpha$  毒素は、細胞膜上に非選択性のイオンチャネルである pore (孔) を形成して膜を破壊する細胞壊死毒素 (孔形成毒素) である。我々はこれまで *C. septicum*  $\alpha$  毒素の病原性発現のメカニズムを解明するため、細胞への結合から細胞壊死を起こす過程の  $\alpha$  毒素の細胞膜上での動態および細胞側の要因との関連性を分子レベルで解析し明らかにしてきた。ヒトにおいては *C. septicum* によるガス壊疽の直接的な死因は筋肉壊死ではなく毒血症による心原性ショック (急性心不全) であると考えられている。家畜においては循環器系への  $\alpha$  毒素の関与は明らかになっていないが、突然死を引き起こすことがよく知られていることから、ヒトと同様に心原性ショックを誘導することは十分考えられる。

*C. septicum*  $\alpha$  毒素は感染組織深部において、 $\alpha$  毒素前駆体として菌体外に分泌され、GPI-アンカー蛋白を受容体として細胞表面に結合した後、蛋白分解酵素で限定分解を受け、活性型  $\alpha$  毒素となる。活性型  $\alpha$  毒素は脂質ラフトに集積し、6~7 量体のオリゴマーとなり細胞膜上に孔 (非選択性イオン透過性チャネル) を形成することで細胞死を引き起こす。オリゴマー形成のためのラフトへの集積には細胞膜上のコレステロールが必須の分子として関与する。我々は  $\alpha$  毒素が心筋細胞初代培養に対して細胞壊死を起こす前に急速に自立性拍動を停止させること、灌流ラット心臓を用いた実験で、接種毒素の濃度依存的に心拍速度が低下および消失することを明らかにした。このことは  $\alpha$  毒素がガス壊疽の死亡原因である心原性ショックに深く

関わっていることを示唆している。

## 2. 研究の目的

(1) *C. septicum*  $\alpha$  毒素による心拍動停止機序の生化学的および電気生理学的解析  
自立拍動するラット胎児心筋細胞初代培養を用いて、 $\alpha$  毒素が受容体を介して心筋細胞に結合してから孔形成に至る過程の中でどの段階で拍動停止を引き起こすのか、さらに心筋収縮に関わる  $Ca^{2+}$  放出チャネルやシグナル伝達系への関与について分子レベルで明らかにする。

(2)  $\alpha$  毒素分子のトリプトファンに富む領域の細胞障害活性における役割

活性化  $\alpha$  毒素は 366 残基のアミノ酸で構成されており、相同性の高い *Aeromonas hydrophila* のヘモリジンで解明されている結晶構造より高次構造が推測されている。これまでの解析結果から細胞膜貫通領域は  $K^{203} \sim Q^{232}$  であると考えられる。特に 333 番目から 342 番目のアミノ酸領域にトリプトファンに富む特異的な領域が存在しており、細胞膜上の受容体との結合に関与している可能性が考えられる。そこで、この領域に点変異体を作成し、細胞障害活性を指標として、細胞との結合に関わる  $\alpha$  毒素分子の領域について解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) $\alpha$ 毒素の精製

*C. septicum* (NCTC547) を Brain heart infusion 培地 (BHI, OXOID) に接種し、37°C で 24 時間嫌氣的に培養した。遠心上清に最終濃度が 60% になるように硫酸アンモニウムを加え 4°C で一晩静置した。遠心後、沈殿を 20 mM phosphate buffer (pH 7.0, 以下 buffer A) に懸濁し、buffer A で約 2 日間透析した。イオン交換クロマトグラフ

イー (SP-Toyopearl 650M (TOSH0)) に遠心上清を添加し、buffer A で平衡化した後、NaCl 濃度 0~300 mM の直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の SDS-PAGE を行い、CBB (nacalai tesque) で染色確認後、目的の蛋白を含むフラクションを回収した。

リコンビナント  $\alpha$  毒素はすでに報告している方法 (Microbiol. Path. 37:279-286, 2004) により調製した。

## (2) 部位特定変異体の作出

$\alpha$  毒素遺伝子が pUC19 に挿入されているプラスミド pUC19/ $\alpha$  を鋳型として、トリプトファンに富む領域のアミノ酸置換を変異部位を含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、Quick Change Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene) のプロトコールに沿って実施した。変異遺伝子も pET30a にクローニングし、大腸菌で発現後変異体  $\alpha$  毒素を精製した。

(3) ラット胎児心筋初代培養細胞の調製  
胎齢 16~17 日のラット (Wistar) から心臓を取り出し、心房を除去後、心室を細切した。0.05% collagenase (Type IV) を含有する Hanks' Balanced Salt Solution (Ca/Mg free)-HEPES (10 mM) 7~8 ml を加え、37°C で 30 分間振盪し消化した。180  $\mu$ g、10 分間、37°C で遠心し細胞を回収した。10% FCS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に細胞を懸濁し、直径 35 mm Tissue Culture Dish または直径 15.5 mm 4 穴プレートに播いた。5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で 1 日培養し、翌日培地交換を行いさらに 2~3 日間培養し実験に使用した。

(4) 毒素による心筋細胞拍動リズムへの影響

### ① 動画の撮影

倒立顕微鏡のステージを 37°C に加温した状態で心筋細胞を静置し、CCD camera で自立

拍動する心筋細胞を撮影した。MTU2400FX (Canopus Co., Ltd., Japan) を用いて MPEG 形式 (30 フレーム/秒) で動画をデジタル化して Windows computer に取り込み、テレビ録画/コントロールソフト FEATHER for USB で録画・保存した。

### ② 毒素の添加

10% FCS 含有 DMEM 中で自立拍動する培養心筋細胞の培地を全て回収し、 $\alpha$  毒素を 20  $\mu$ g/ml の濃度で含有する DMEM (FCS free) に置き換えた。以下の記述における  $\alpha$  毒素の添加濃度も全て 20  $\mu$ g/ml で行った。

### ③ 拍動リズムの解析

拍動リズムの評価は Yamauchi らの方法によるソフトウェアでの解析法に一部修正を加えた拍動解析ソフト VisoRhythm を用いた。動画中で心筋細胞が自立拍動している区画 (150-400 pixels) を任意で選ぶと、その区画におけるフレーム間の相互相関率が測定される。これは、選択した区画内の輝度の経時変化を表し、心筋細胞の拍動リズムに相当する。このソフトウェアにより Excel ファイルに出力されるデータからコレログラムを作成した。

(5)  $\alpha$  毒素の拍動停止作用に対する細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度の影響

Ca<sup>2+</sup> 1.8 mM 含有 DMEM に無水塩化カルシウム (Wako) を加えることで、Ca<sup>2+</sup> 濃度を 3.6 mM あるいは 5.4 mM とした DMEM に 20  $\mu$ g/ml になるよう  $\alpha$  毒素を加えた各毒素サンプルを心筋細胞に添加し、拍動リズムの変化を解析した。また、DMEM に Ca<sup>2+</sup> free の DMEM (GIBCO) を加えて 1 mM に希釈し、さらに 10 倍階段希釈により 0.01  $\mu$ M まで希釈した DMEM に  $\alpha$  毒素を加えた各毒素サンプルを心筋細胞に添加し、拍動リズムの変化を解析した。

(6)  $\alpha$  毒素の拍動停止作用に対する ATP

## 添加の影響

Ca<sup>2+</sup>を1 mMまたは0.1 μMの濃度で含有するDMEMにα毒素を加えた各毒素サンプルを心筋細胞に添加し、拍動停止後直ちにATP (Boehringer Mannheim GmbH) を終濃度0.2 mMになるよう添加し、拍動リズムの変化を解析した。ATP添加により拍動が再開したときは、その拍動の停止後に終濃度0.4 mMになるようさらにATPを添加した。

### (7) 細胞致死活性

96 ウェルに培養した Vero 細胞を PBS (-) で1回洗浄後、DMEMで希釈したα毒素または変異体α毒素を100 μlずつ4ウェルに添加し、37°C2時間反応させた。毒素活性はMTT法を用いた。CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を20 μlずつ各ウェルに添加し、37°C1時間反応させた。上清の吸光度を490nmで測定した。4ウェルの吸光度の平均値、100%細胞が生存しているときの吸光度および100%細胞が致死したときの吸光度より以下の式で細胞致死率(%)を測定した。

$$\text{細胞致死率 (\%)} = \frac{\text{各毒素濃度での吸光度} - \text{100\%細胞致死での吸光度}}{\text{0\%細胞致死での吸光度} - \text{100\%細胞致死での吸光度}} \times 100$$

50%細胞致死濃度 (EC<sub>50</sub>) は各毒素濃度での細胞致死率を基に算出した。

### (8) Toxin overlay assay

Vero 細胞を Cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM NaCl, 1% Triton X 114, 1% Protease Inhibitor cocktail) 100 μl で懸濁した細胞を氷上で1時間静置し可溶化した。16,000 xg、15分間、4°Cで遠心し、上清を新しいチューブに移し、沈渣は Cell lysis buffer 100 μl で懸濁し、それぞれ可溶性画分サンプル、不溶性画分サンプルとした。可溶化および不溶化画分を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に電気転写し、5% skim milk で 4°C一晩ブロッキングした。PVDF 膜

をα毒素 (1 μg/ml) と室温で1時間反応させた後、0.1% Tween 20 含有 PBS で5分間の洗浄を3回行った。アフィニティー精製ウサギ抗α毒素 IgG (5 μg/ml) を一次抗体として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:3000) を二次抗体として反応させた。0.5 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 含有0.55% 過酸化水素水で発色させた。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度変化による拍動停止への影響

Ca<sup>2+</sup>を1 mMの濃度で含有するα毒素を心筋細胞に添加したところ、拍動リズムが速くなった後、急速な自立拍動の停止に至った。拍動停止に至るまでの収縮では同調性がみられた。拍動停止後、拍動の再開は起こらなかった (Fig. 1A)。また、1.8 mM、3.6 mM、5.4 mM の Ca<sup>2+</sup>存在下でα毒素を心筋細胞に処理した結果は、Ca<sup>2+</sup>濃度が1 mMの場合と同様であった。

μM の Ca<sup>2+</sup>存在下でα毒素を心筋細胞に処理したところ、拍動リズムがやや速くなり、Ca<sup>2+</sup>濃度が1 mMの場合に比べ短時間で拍動が停止した。拍動停止に至るまでの収縮では同調性がみられた。その後、拍動の再開が起こったが、この時の拍動では細胞間の同調性がみられなかった。拍動が再開するタイミングも細胞間で異なっていた。再び拍動が停止してから拍動が再開することはなかった (Fig. 1B)。また、100 μM、10 μM、1 μM、0.01 μM の Ca<sup>2+</sup>存在下でα毒素を処理した結果は Ca<sup>2+</sup>濃度が0.1 μMの場合と同様であった。拍動リズムが速くなるという現象は、筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>が過剰になることにより、筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup>放出頻度が増加したためであると考えられる。Ca<sup>2+</sup>濃度が0.1

$\mu\text{M}$  以下の場合、細胞外への  $\text{Ca}^{2+}$  の流出により、細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低くなり拍動が一旦停止すると考えられる。その後、 $\text{Ca}^{2+}$  ポンプにより細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  が筋小胞体内へ取り込まれると細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が細胞外に比べ低くなるため、細胞外から細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が起こり、筋小胞体内へ  $\text{Ca}^{2+}$  が蓄積されることで拍動が再開したものと推察される。細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  の過剰によるミトコンドリア障害からの ATP 産生の低下や、激しい収縮運動による ATP の消費などにより ATP が枯渇した可能性が考えられる。この結果、心筋細胞が収縮不能となり拍動が停止したと推察される。

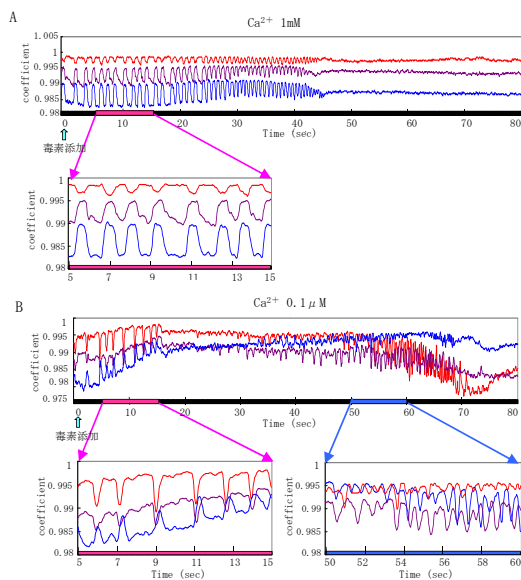


Fig. 1. 心筋細胞拍動リズムの解析  
 $\alpha$  毒素 ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) を心筋細胞に添加した。  
 (A) 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $1 \text{ mM}$   
 (B) 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $0.1 \mu\text{M}$

## (2) 毒素処理細胞への ATP 添加による影響

$1 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  存在下で  $\alpha$  毒素を心筋細胞に処理し、心筋細胞が拍動を停止した時点で ATP を終濃度  $0.2 \text{ mM}$  になるよう添加した。拍動の再開が起こったが、この時の拍動では細胞間での同調性がみられなかった。拍動が再開するタイミングも細胞間で異なっ

ていた。再び拍動が停止した時点でさらに ATP を添加したが、拍動が再開することはなかった (Fig. 2A)。

$0.1 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  存在下で  $\alpha$  毒素を心筋細胞に処理し、二度目に拍動が停止した時点で ATP を終濃度  $0.2 \text{ mM}$  になるよう添加した。拍動の再開が起こったが、細胞間での同調性はみられなかった。ATP 添加から拍動再開までの時間は、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が  $1 \text{ mM}$  の場合と比べ若干短い傾向にあった。再び拍動が停止した時点でさらに ATP を添加したが、拍動が再開することはなかった (Fig. 2B)。細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  の過剰によるミトコンドリア障害からの ATP 産生の低下や、激しい収縮運動による ATP の消費などにより ATP が枯渇した可能性が考えられる。この結果、心筋細胞が収縮不能となり拍動が停止したと推察される。

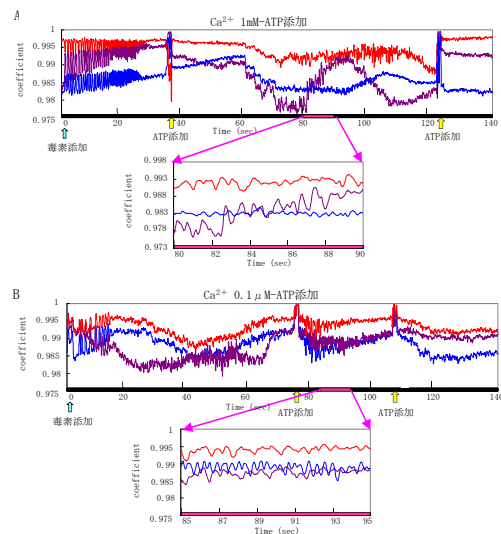


Fig. 2. 心筋細胞拍動リズムの解析  
 心筋細胞を  $\alpha$  毒素 ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) で処理し、拍動停止後 ATP ( $0.2 \text{ mM}$ ) を添加した。  
 (A) 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $1 \text{ mM}$   
 (B) 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $0.1 \mu\text{M}$

## (3) $\alpha$ 毒素のトリプトファンに富む領域の毒素活性に影響するアミノ酸の特定

リコンビナント  $\alpha$  毒素遺伝子を鋳型にし、333、337、338、339、340、341、342 番目のアミノ酸をアラニン、アルギニンまたはフェニルアラニンに置換した点変異体を作製した (Fig. 3)。W338A、W340A、W342A はいず

れも毒素活性が完全に消失した。W338F および W342F は毒素活性が減少したが W340F は活性を保持していた。339 番目のアスパラギン酸はリジンに変異させ電荷を変えたときのみ活性が減少した。その他のアミノ酸置換では活性に変化は見られなかった (Table 1)。Toxin overlay assay での、点変異体の細胞可溶性分子への結合解析において、毒素活性が減少した変異体にのみ結合が見られなかった (図示せず)。

以上のことから 338 および 342 番目のトリプトファン、340 番目の疎水性アミノ酸、339 番目の負電荷アミノ酸の存在が毒素活性および細胞構成分子との結合に重要であることが明らかとなった。

	333	343
$\alpha$ toxin	NGYSEWDKWKV	
N333A	AGYSEWDKWKV	
E337R	NGYREWDKWKV	
W338A	NGYSEADKWKV	
W338F	NGYSEFDKWKV	
D339A	NGYSEWAKWKV	
W340A	NGYSEWDKWKV	
W340F	NGYSEWDFKWKV	
K341E	NGYSEWDREWV	
K341R	NGYSEWDRWV	
W342A	NGYSEWDWKA	
W342F	NGYSEWDWKFV	

Fig. 3. 作製した  $\alpha$  毒素変異体

Table 1. 変異体の細胞致死活性

mutant	EC <sub>50</sub> (ng/ml)
$\alpha$ toxin	29.7
N333A	21.2
E337R	30.3
W338A	>640.0
W338F	207.0
D339A	127.1
W340A	>640.0
W340F	25.8
K341E	36.4
K341R	25.5
W342A	>640
W342F	113.2

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Nakamura K, Kohda T, Umeda K, Yamamoto H, Mukamoto M, Kozaki S. Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. *Vet. Microbiol.* (査読有) 140:147-154 (2010)

[学会発表] (計 1 件)

1. 向本雅郁、松村朋恵、幸田知子、小崎俊司 *Clostridium septicum*  $\alpha$  毒素による心原性ショックの病態生理機構の解明 第 57 回トキシシンポジウム 2010 年 7 月 15 日、長浜市

[図書] (計 1 件)

1. 向本雅郁、株式会社サイエンスフォーラム、微生物孢子、2011 年、370 ページ (128-131)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向本 雅郁 (MUKAMOTO MASAFUMI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：80231629

### (2) 研究分担者

小崎 俊司 (KOZAKI SHUNJI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：10109805