

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 5 月 28 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590500

研究課題名（和文）ウエルシュ菌 β 毒素の細胞膜ラフトを介する情報伝達系活性化の分子機構の解析研究課題名（英文）Study of *Clostridium perfringens* beta-toxin: binding to lipid-rafts and effect on signal transduction.

研究代表者

永浜 政博 (Nagahama Masahiro)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：40164462

研究成果の概要（和文）：ウエルシュ菌の β 毒素は、血液系の細胞である THP-1 細胞の細胞膜脂質ラフトの結合してオリゴマーを形成後、内因性ホスホリパーゼ C を活性化して、生じた IP_3 が、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、カルモジュリン-カルシニューリンシグナル伝達系が活性化し、細胞傷害作用を示すことを明にした。さらに、本毒素により、PI の取り込みや細胞の Swelling が認められることから、細胞に対してネクロシスを誘導することが判明した。

研究成果の概要（英文）：Incubation of THP-1 cells with *C. perfringens* beta-toxin showed the formation of oligomer on lipid rafts. Beta-toxin induced the activation of endogenous phospholipase C and production of IP_3 . IP_3 -induced Ca^{2+} uptake caused the activation of calmodulin-calcineurin signaling pathway. As beta-toxin caused PI entry and cell swelling, beta-toxin produced cytotoxic activity through necrosis.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：ウエルシュ菌・ β 毒素・THP-1 細胞・マイクロドメイン・ネクロシス

1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌の産生する β 毒素は、致死、壊死活性を有し、本菌による高い致死率を示す壊疽性腸炎の病原因子と考えられている。我々は、 β 毒素の遺伝子配列を解明し、本毒素はブドウ球菌が産生するオリゴマー形成毒素とアミノ酸配列の相同性を示すことから、 β 毒素もオリゴマーを形成することを初めて提唱した。 β 毒素の感受性細胞の検索を行ったところ、本毒素はヒト急性前骨髄性白

血病細胞である HL-60 細胞が本毒素に感受性であることを初めて明らかにした。 β 毒素はこの細胞に対して K^+ イオンの流出や細胞破壊作用を示し、さらに、本毒素は HL-60 細胞の細胞膜ラフトドメインに結合してオリゴマーを形成し、オリゴマーで形成されたポアア的作用により、細胞膜が破壊されることを明らかにした。そこで、本毒素のシグナル伝達系に対する作用を調べると、内因性のホスホリパーゼ C を活性化し、生成したイノシト

ール3リン酸が小胞体からCa²⁺イオンの細胞内への遊離することを明らかにした。本研究の目的は、β毒素の作用をより正確に理解するため本毒素が感受性細胞の免疫系細胞に対してどのような作用を示すのかを明らかにする。

2. 研究の目的

(1) β毒素の細胞レベルでの作用：β毒素の血液系細胞やリンパ球系培養細胞に対する毒性から、細胞レベルでの作用を明らかにする。

(2) β毒素の *in vivo* における作用：β毒素投与後の血中リンパ系細胞の傷害を明らかにし、また、本毒素によるサイトカイン遊離量を検討し、本毒素の致死活性に対する免疫系の役割を解明する。

(3) β毒素の分子レベルでの作用：β毒素は、細胞膜ラフトドメインに結合し、カルシニューリンシグナル伝達系を活性化するので、細胞表面のラフトに存在すると考えられる特異的なレセプターを明らかにする。さらに機能タンパクのノックダウンやDominant-negative体などを用い、シグナル伝達系に影響する機能タンパク質を分子レベルで詳細に解明する。

(4) β毒素の立体構造の解析：β毒素のオリゴマー形成機構を分子レベルで明らかにするため、毒素を大量に精製して結晶化を行う。良い結晶が得られれば、構造解析を行い毒素分子の構造を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) β毒素の免疫系細胞に対する作用の解析：セルライン化された単球系、T細胞系、B細胞系の培養細胞、そして、好中球などを用いて、β毒素が細胞毒性、そして、ラフトへの結合にどの程度の差を示すのか検討した。β毒素の細胞膜ラフトへの結合は、超遠心機を用いた分子間相互作用解析装置でラフトを分離後、検出はイメージ解析システムを用いて行った。これらの結果から、β毒素の細胞膜ラフトへの特異的な結合が細胞毒性と密接に関連しているかどうかを詳細に検討する。

(2) β毒素の細胞膜ラフトへの結合の可視化：細胞膜ラフトへの結合と細胞内輸送を検討するため、抗β毒素抗体を使用した蛍光抗体法で毒素を染色し共焦点レーザー顕微鏡での毒素とラフトの共局在を明らかにする。また、本毒素の細胞内侵入を確かめるため、初期エンドソームのマーカーであるRab5やカベオリンのGFP体をトランスフェクトした細胞を使用して検討する。

(3) β毒素の受容体-シグナル伝達系への作

用：β毒素は、内因性ホスホリパーゼC(PLC)を活性化して細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる。そこで、カルモジュリン(CaM)-カルシニューリン(CN)シグナル伝達系の活性化を検討する。さらに、毒素による細胞内Ca²⁺濃度の変化をリアルタイムに測定後、CaMやCNのノックダウンやDominant-negative体、さらに、毒素処理後の細胞内でのCNの局在を抗CN抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、毒素によるCN活性化後の挙動を解明する。

4. 研究成果

(1) β毒素を血液系細胞であるのHL-60細胞、THP-1細胞、U937細胞、BALL-1細胞、MOLT-4細胞に作用させると、いずれも細胞の膨化が観察された。この中で、THP-1細胞とU937細胞にβ毒素は感受性がもっとも強く、本毒素の細胞毒性はラフトを破壊するMbCD処理で阻害された。そこで、β毒素のラフトへの結合を調べると、感受性が強いTHP-1細胞とU937細胞のラフトに、本毒素はオリゴマーを形成して強く結合することが判明した。そこで、THP-1細胞に対する本毒素の結合を蛍光抗体法で測定すると、本毒素は、細胞膜表面に結合し、細胞内には侵入しないことが判明した。これに対し、β毒素による細胞毒性は、内因性PLC活性を阻害するU73122処理で抑制された。すなわち、本毒素は、THP-1細胞膜のラフトでオリゴマーを形成後、細胞膜のPLCを活性化して細胞毒性を示すと考えられる。

(2) β毒素は、THP-1細胞の細胞骨格蛋白質にどのような変化を示すかを明らかにするため、蛍光染色法で解析すると、毒素によりアクチンとチューブリンが少し減少したが大きな変化は認められなかった。次に、β毒素をマウスに投与して、末梢血由来の免疫系細胞の変化を測定すると、CD4陽性のTh細胞や、CD19陽性のB細胞が低下し、細胞毒性を示した。そこで、本毒素による、血中サイトカイン量の変化を測定すると、約1時間後から、血中TNFα、IL-4、IL-10量の増加が認められた。以上の結果から、β毒素は、免疫系細胞の細胞骨格タンパクの大きな変化は誘導しないことが明らかとなった。さらに、*in vivo* において本毒素は、特定の免疫系細胞に作用して、サイトカイン遊離を誘導することが明らかとなった。

(3) β毒素のTHP-1細胞に対する細胞死を検討すると、本毒素により、細胞の核の断片化は認められず、PIの取り込みや細胞のSwellingが認められることから、細胞に対してネクロシスを誘導することが判明した。β毒素の構造解析については、β毒素遺伝子を使用し

て、大腸菌で組換え体の大量発現と精製法を確立して、 β 毒素の大量精製を行った。毒素タンパク質を種々のスクリーニングbufferを用いて結晶化を行っている過程である。これにより、X線解析が可能な毒素の結晶を作製する。

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 12 件)

- 1) Imagawa H, Nagahama M 他 15 名 10 番目 査読有 Syntheses of structurally-simplified and fluorescently-labeled neovibsanin derivatives and analysis of their neurite outgrowth activity in PC12 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 22, 2089-2093 (2012)
- 2) Oda M, Nagahama M 他 3 名 4 番目 査読有 Role of side-edge site of sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press (2012)
- 3) Nagahama M, Kobayashi K 他 6 名 1 番目 査読有 *Clostridium perfringens* iota-b induces rapid cell necrosis. *Infect. Immun.* 79, 4353-4360 (2011)
- 4) Nagahama M, Kobayashi K 他 8 名 1 番目 査読有 Cellular vacuolation induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *FEBS J.* 278, 3395-3407 (2011)
- 5) Oda M, Nagahama M 他 3 名 4 番目 査読有 Induction of neurite-outgrowth in PC12 cells by alpha-toxin from *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 241-246 (2011)
- 6) Miyamoto K, Nagahama M 他 5 名 4 番目 査読有 Identification of novel *Clostridium perfringens* Type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. *PLoS one* 6, e20376 (2011)
- 7) Nagahama M, Kobayashi K 他 5 名 1 番目 査読有 *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. *Infect. Immun.* 79, 905-910 (2011)
- 8) Imagawa H, Nagahama M 他 9 名 11 番目 査読有 Synthesis and evaluation of novel phosphate ester analogs as neutral sphingomyelinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett* . 20, 3868-3871(2010)
- 9) Oda M, Nagahama M 他 4 名 5 番目 査読有 Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochem. Biophys. Acta* 1798, 1073-1080 (2010)
- 10) Sakurai J, Nagahama M, Kobayashi K 他 2 名 2 番目 査読有 *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins* 1,

208-228 (2009)

- 11) Nagahama M 他 8 名 1 番目 査読有 Binding and internalization of *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Infect. Immun.* 77, 5139-5148 (2009)
- 12) Tumurkhuu G, Nagahama M 他 10 名 10 番目 査読有 The inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by *Clostridium perfringens* alpha-toxin and its relation to alpha-toxin-induced intracellular ceramide generation. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 554-562 (2009)

[学会発表] (計 92 件)

1. 永浜政博 他 ウエルシュ菌 ϵ 毒素の MDCK 細胞に対する空胞形成機構の解析. 第 85 日本細菌学会総会 (長崎) 平成 24 年 3 月 27-29 日
2. 小林敬子, 永浜政博 他 ウエルシュ菌イオタ b 成分の細胞毒性機構の解析. 第 85 日本細菌学会総会 (長崎) 平成 24 年 3 月 27-29 日
3. 小林敬子, 永浜政博 他 ウエルシュ菌イオタ Ib 成分の細胞毒性の検討. 文科省戦略的研究基盤形成支援事業 第 7 回研究発表会 (徳島) 平成 23 年 12 月 22 日
4. 田代遼, 小林敬子, 永浜政博 他 ウエルシュ菌イオタ毒素の Ib 成分による細胞毒性の解析. 第 50 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (高松) 平成 23 年 11 月 12, 13 日
5. 小林敬子, 永浜政博 他 ウエルシュ菌イオタ b 成分の細胞毒性の解析. 第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (岡山) 平成 23 年 10 月 22, 23 日
6. M. Nagahama, K. Kobayashi et al. *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily. IUMS2011 International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 6-10, 2011.
7. 小田真隆, 永浜政博 他 ウエルシュ菌 α 毒素のガングリオシド認識ドメインの同定. 第 58 回トキシシンポジウム (東京) 平成 23 年 7 月 6-7 日
8. 永浜政博 ウエルシュ菌のオリゴマー形成毒素について. 文科省戦略的研究基盤形成支援事業 第 6 回研究発表会 (徳島) 平成 23 年 7 月 9 日
9. 渋谷昌弘, 永浜政博, 小林敬子 他 ウエルシュ菌 β 毒素による THP-1 細胞の MAPKp38 のリン酸化の解析. 日本薬学会 第 131 年会 (静岡) 平成 23 年 3 月 28-31 日
10. 渋谷昌弘, 永浜政博, 小林敬子 他 ウエルシュ菌 β 毒素による THP-1 細胞の MAPKp38 のリン酸化. 文科省戦略的研究基盤形成支援事業 第 6 回研究発表会 (徳島) 平成 22

年 12 月 22 日

11. 永浜政博,小林敬子 他 ウエルシュ菌 ϵ 毒素の MDCK 細胞 F-アクチン増加効果の検討. BMB2010 (神戸) 平成 22 年 12 月 7-10 日

12. 樋口真美,小林敬子,永浜政博 他 ボツリヌス菌 C2 毒素の細胞内侵入における TrkA の役割. 第 49 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (米子) 平成 22 年 11 月 6, 7 日

13. 蕪道子,永浜政博,小林敬子 他 ウエルシュ菌 α 毒素による IL-8 遊離と GM1 の関係. 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (松山) 平成 22 年 10 月 16, 17 日

14. 永浜政博,小林敬子 他 ウエルシュ菌イオタ毒素の Ib 成分の細胞に対する作用の解析. 日本薬学会 第 130 年会 (岡山) 平成 22 年 3 月 28-30 日

15. 小林敬子,永浜政博 他 ボツリヌス菌 C2 毒素による PI3K/Akt シグナル伝達系の活性化とエンドサイトーシスにおける役割. 第 83 回日本細菌学会総会 (横浜) 平成 22 年 3 月 27-29 日

16. 梅崎真理子,永浜政博,小林敬子 他 ウエルシュ菌イオタ毒素の Ib 成分の細胞毒性の検討. 文科省戦略的研究基盤形成支援事業 第 2 回研究発表会 (徳島) 平成 21 年 12 月 19 日

17. 阪口義彦,小林敬子,永浜政博 他 C 型と D 型ボツリヌス菌ホスホリパーゼ C の酵素活性と生物活性. 第 32 回 日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 21 年 12 月 9-12 日

18. 蕪道子,永浜政博 他 ウエルシュ菌 α 毒素による IL-8 分泌と TrkA の関係. 第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (徳島) 平成 21 年 11 月 7, 8 日

19. 梅崎真理子,永浜政博,小林敬子 他 ウエルシュ菌イオタ毒素のイオタ b 成分の培養細胞に対する作用. 第 62 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (広島) 平成 21 年 10 月 16, 17 日

[図書] (計 3 件)

1. 渡部一仁ら編集 永浜政博,サイエンスフォーラム社、微生物孢子-制御と対策-(2011) 380 ページ

2. Oda M, Nagahama M, Kobayashi K InTech (open access), Phosphorylation, Role of tyrosine kinase A receptor (TrkA) on pathogenicity of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. (2012) 20 ページ

3. Nagahama M, Kobayashi K InTech (open access), Glycosylation, Glycosylating toxin of *Clostridium perfringens*. (2012) 20 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永浜 政博 (Nagahama Masahiro)

研究者番号 : 40164462

(2) 研究分担者

小林 敬子 (Kobayashi Keiko)

研究者番号 : 90170315

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :