

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790420

研究課題名 (和文) 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の細胞傷害機構の解析と脂質ラフトプローブとしての応用

研究課題名 (英文) The cytotoxic mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and its application to a probe for lipid rafts

研究代表者

松田 重輝 (MATSUDA SHIGEAKI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：30506499

研究成果の概要 (和文)：腸炎ビブリオの産生する耐熱性溶血毒 (TDH) は培養細胞の細胞膜ラフトにアソシエイトする。TDH の細胞傷害性にラフトからのエンドサイトーシスが関係するかどうかを検討したが、TDH の細胞傷害性に既知のエンドサイトーシス経路が関係する可能性は低いと考えられた。また、TDH の赤血球に対する溶血作用はラフト非依存的であり、TDH の細胞傷害機構と溶血機構は完全には同一ではないと考えられた。さらに、細胞傷害活性とラフトへのアソシエーション能に変化がない TDH の直接蛍光標識体を作製することができた。

研究成果の概要 (英文)： *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin (TDH) is associated with lipid rafts of cultured cells. This study addressed whether internalization of TDH correlates with its cytotoxicity. Inhibition of endocytosis did not affect TDH cytotoxicity for HeLa cells, indicating that internalization of TDH is not involved in its cytotoxicity. In contrast to cytotoxicity, hemolysis by TDH was independent of lipid rafts, suggesting that the mechanism of cytotoxicity by TDH appears to differ from that of hemolysis by TDH. Fluorescent dye-conjugated TDH was also constructed. This conjugate retained the cytotoxicity and was associated with lipid rafts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：細菌学 (含真菌学)

キーワード：腸炎ビブリオ、耐熱性溶血毒、細胞傷害性、脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

我が国の主要な食中毒原因菌である腸炎ビブリオの産生する耐熱性溶血毒 (TDH) は、本菌の主要な病原因子である。TDH は生物活性として、赤血球に対する溶血活性や培養細胞に対する細胞傷害活性、

腸管毒性、心臓毒性を示し、特に溶血活性の研究から、TDH は孔形成毒素として作用することが知られている。TDH の病原性においてはその細胞傷害活性が重要と考えられる。しかしながら、現在に至るまで TDH の研究はその溶血活性が中心であり、細胞傷

害活性についてはカルシウムイオン流入の誘導が報告されているがTDHの細胞傷害性については細胞側の標的因子（受容体）を含め、多くが不明である。TDHを細胞に処理すると脂質ラフト（ラフト）と呼ばれる細胞膜マイクロドメインにアソシエイトすることから、本研究ではTDHの細胞傷害機構におけるラフトの役割に着目した。

2. 研究の目的

ラフトはスフィンゴ糖脂質・スフィンゴミエリン・コレステロールに富む細胞膜マイクロドメインであり、細胞膜上での膜輸送やシグナル伝達に重要な役割を果たすとともに、様々な病原体・病原因子の標的となっている。TDHがラフトとアソシエイトすることから、本研究ではTDHとラフトの関係に着目し、TDHの細胞傷害性の発現におけるラフトの役割の検証、およびTDHを用いたラフトに対する新規のプロープの作出を目的とした。

3. 研究の方法

(1) TDHの細胞傷害活性におけるエンドサイトーシスの役割の評価

クラスリン依存的なエンドサイトーシスは低浸透圧ショックならびにポタジウム除去によって、カベオラ依存的なエンドサイトーシスはナイスタチン、ゲニステイン処理によって阻害し、TDHによる細胞傷害活性を測定することで、TDHの細胞傷害活性におけるエンドサイトーシスの役割を評価した。

(2) TDHのラフトへのアソシエーションとスフィンゴミエリンの関係

TDHの細胞傷害性を競合阻害するTDH無毒変異体を用いて、スフィンゴミエリン結合毒素ライセニンの細胞傷害性の競合阻害を検討した。

(3) TDHの赤血球に対する溶血作用におけるラフトの関与

コレステロール除去によりラフトを破壊するメチル-β-シクロデキストリンを用いて赤血球ラフトがTDHの溶血活性に関与するかどうかを評価した。ヒト赤血球をメチル-β-シクロデキストリンで前処理し、TDHを添加して溶血活性を評価した。

(4) TDHの蛍光標識体の作製

TDHの蛍光標識体は、TDHのアミノ基をFITCでラベル化または、マレイミド反応性蛍光色素によりTDHのチオール基に蛍光色素をカップリングすることで作製した。作製した蛍光

標識体の細胞傷害性を測定した。また、蛍光標識体の培養細胞上の分布パターンを蛍光顕微鏡により評価し、TDHのタグ融合体と比較した。ラフトへのアソシエーションは、ラフトの分画の定法である、ラフトの界面活性剤不溶性を利用したショ糖密度勾配遠心法により細胞からラフトを分画して評価した。

4. 研究成果

(1) TDHの細胞傷害性はエンドサイトーシス非依存的である

ラフトは様々な病原体や毒素の侵入経路と考えられている。TDHがラフトにアソシエイトすること、過去の報告でTDHの細胞内移行の可能性が示唆されていることから、本研究ではTDHの細胞傷害性にラフトからのエンドサイトーシスが関係するかどうかを検討した。しかしながら、クラスリンまたはカベオラ依存的な既知のエンドサイトーシス阻害による、TDHの細胞傷害性への影響は観察されなかった。このことから、TDHの細胞傷害活性にクラスリンまたはカベオラ依存的な既知のエンドサイトーシス経路が関係する可能性は低いと考えられた。

(2) TDHのラフトへのアソシエーションとスフィンゴミエリンの関係

細胞をスフィンゴミエリン分解酵素で前処理すると、TDHのラフトへのアソシエーションならびに細胞障害活性が阻害される。TDHの認識するラフトと、スフィンゴミエリン結合毒素であるライセニンの認識するラフトが異なるかどうかを検証した。TDH無毒変異体はTDHによる細胞傷害性および細胞内へのカルシウムイオン流入を競合阻害するものの、スフィンゴミエリン結合毒素であるライセニンの細胞傷害性は阻害できないことが示された。TDHはスフィンゴミエリン分子と直接相互作用しないことから、TDHはライセニンの認識するスフィンゴミエリンドメインと異なるラフトとアソシエイトしていることが示唆された。

(3) TDHの赤血球に対する溶血作用はラフト非依存的である

メチル-β-シクロデキストリンの前処理（0-8 mM）により赤血球のラフトを破壊しても、TDHの溶血活性に影響を与えなかった。すなわち、TDHの赤血球に対する溶血作用はラフト非依存的であった。これに対しTDHの細胞傷害活性はラフト依存性であり、TDHの細胞傷害機構と溶血機構（孔形成）が完全には同一ではないことが示唆された。

(4) TDHの蛍光標識体の作製

TDHの生細胞上での時空間的挙動を観察するために、TDHの直接蛍光標識体を作製した。

チオール基の蛍光標識体は細胞傷害活性が完全に残存していた(図1)。この蛍光標識体を細胞に処理し、細胞を分画するとラフト画分で検出されることから、ラフトへのアソシエーション能に変化がないことが確認された。この蛍光標識体の細胞上での分布パターンは、これまでに作製したTDH タグ融合体の分布パターンと類似していた。生細胞に用いるプローブとしては、TDH の細胞傷害性が障害となるため、TDH 無毒変異体について、TDH と同様に直接蛍光標識を試みた。しかしながら、現在までのところプローブとして生細胞に利用可能な TDH 無毒変異体の蛍光標識体の作製には成功しておらず、今後の課題となった。

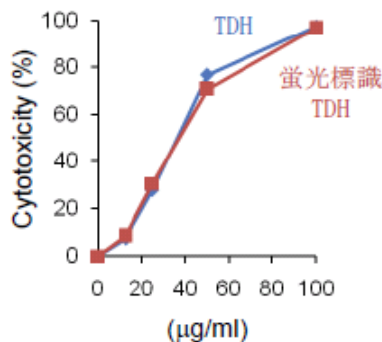


図1 蛍光標識TDHの細胞毒性

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3件)

①K. Okayama, T. Honda, S. Matsuda, T. Saito, M. Kawase. Demonstration and partial characterization of a bacterial growth enhancer in sera. *Curr. Microbiol.* 62:90-95. 2011 (査読有)

②N. Okada, S. Matsuda, J. Matsuyama, K. S. Park, C. de los Reyes, K. Kogure, T. Honda, T. Iida. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains. *BMC Microbiol.* 10:302, 2010 (査読有)

③S. Matsuda, T. Kodama, N. Okada, K. Okayama, T. Honda, T. Iida. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct Hemolysin with lipid rafts is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infect. Immun.* 78:603-610, 2010 (査読有)

[学会発表] (計7件)

①Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Natsumi Okada, Takeshi Honda, Tetsuya Iida. Cytotoxic effect of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin is dependent on lipid rafts. United States-Japan Cooperative Medical Science Program 45th Annual Joint Meeting on Cholera and Other bacterial enteric infections 2010年12月6-8日 Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan

②松田重輝、児玉年央、岡田奈津実、本田武司、飯田哲也 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の細胞毒性発現には細胞膜ラフトが必要である 第57回毒素シンポジウム 2010年7月14-16日 滋賀県・長浜ロイヤルホテル

③Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Natsumi Okada, Takeshi Honda, Tetsuya Iida. Cytotoxic effect of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin is dependent on lipid rafts. The 4th International RIMD-CVRDC Joint Symposium 2010年6月18日 Okayama Convention Center, Okayama, Japan

④Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Natsumi Okada, Takeshi Honda, Tetsuya Iida. Cytotoxic effect of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin is dependent on lipid rafts. 110th General Meeting on the American Society for Microbiology 2010年5月23-27日 San Diego Convention Center, San Diego, USA

⑤松田重輝、飯田哲也 Genome-wide screening for host factors involved in the cytotoxicity of VepA, a T3SS1 effector of *Vibrio parahaemolyticus* 第83回日本細菌学会総会 2010年3月27-29日 神奈川県・パシフィコ横浜

⑥Natsumi Okada, Tetsuya Iida, Kwon-Sam Park, Naohisa Goto, Teruo Yasunaga, Hirotaka Hiyoshi, Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Takeshi Honda. Identification and characterization of a novel type I/II secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. US-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeti

ng 2009 2009年10月12-14日 San Diego,
USA

⑦ Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama,
Natsumi Okada, Takeshi Honda, Tetsuya Iida.
Association of *Vibrio parahaemolyticus*
thermostable direct hemolysin with lipid
rafts is essential for cytotoxicity but
not hemolytic activity. International
Joint Forum on Infectious Diseases 2009
2009年9月16・17日 Bangkok, Thailand

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 重輝 (MATSUDA SHIGEAKI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：30506499

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：