

機関番号：33916

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790429

研究課題名 (和文) 細菌下痢毒素の粘膜アジュバント作用における cAMP 依存性シグナル伝達経路の関与

研究課題名 (英文) Involvement of the cAMP-dependent signal transduction pathways in the mucosal adjuvant activity by bacterial diarrheal toxin

研究代表者

有満 秀幸 (ARIMITSU HIDEYUKI)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：40367701

研究成果の概要 (和文)：コレラ毒素(CT)の示す粘膜アジュバント活性における cAMP の関与を分子生物学的に解析するため、CT とその変異 CT(E112Q)及び B サブユニット(CTB)を用いて実験を行った。CT は CTB と GM1 の結合を介して脾細胞に結合し、A サブユニットの酵素活性依存的に cAMP 下流シグナルの PKA-CREB 経路の他 p38-CREB 経路も活性化した。また CT を経鼻投与したマウスから調製した脾細胞は、CT 及び E112Q 刺激に対してサイトカインを産生した。これらの活性は E112Q や CTB 処置した脾細胞やマウスでは認められなかったことより、CT の活性による cAMP シグナルはアジュバント活性に何らかの関与をしていると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：In order to analyze the involvement of cAMP in mucosal adjuvant activity induced by cholera toxin (CT) in molecular biological level, various assays were employed by using the CT, its mutant CT(E112Q) and the B subunit (CTB). The CT bound to the splenocytes through the interaction between CTB and GM1, followed by the activation of the PKA-CREB pathway which was downstream signal of cAMP and p38-CREB pathways, dependent on the enzymatic activity of the A subunit. Furthermore, the splenocytes, which were prepared from mice which were administered intranasally with the CT, produced cytokines in response to the stimulation from the CT and E112Q. These activities were neither found in the splenocytes nor the mice treated with E112Q and CTB, indicating that the cAMP-dependent signal transduction induced by the activity of the CT involves some adjuvant activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：シグナル伝達、粘膜免疫、cAMP、下痢毒素、アジュバント

1. 研究開始当初の背景

コレラ菌が産生するコレラ毒素(CT)や毒

素原性大腸菌が産生する易熱性下痢毒素(LT)は細胞内 cAMP を増加させ、宿主に下痢を起こす毒素として知られているが、一方でワクチン抗原とともに経鼻または経口投与することによって、強いアジュバント作用を示すことも知られている。しかしながらこの活性のメカニズムについては cAMP の関与も含め見解が一様ではない。

2. 研究の目的

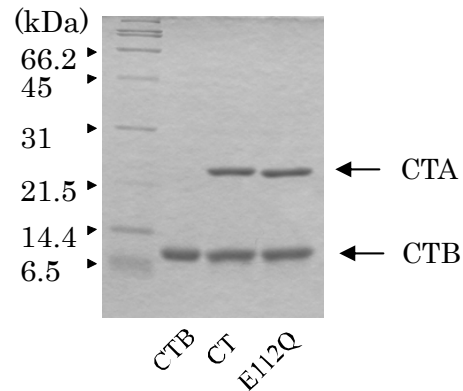
CT と LT は細胞表面の GM1 をレセプターとして結合する 5 分子の B サブユニット (CTB, LTB) と、三量体 G 蛋白 α サブユニットに対する ADP リボシル活性を示す 1 分子の A サブユニット (CTA, LTA) で構成されている。B サブユニットを介して細胞内に取り込まれた毒素は、持続的なアデニル酸シクラーゼの活性化によって細胞内 cAMP を増加させ、腸管内では電解質バランスを破壊させることによって下痢を引き起こす。一方、両毒素ともワクチン抗原とともに経鼻または経口投与すると強い粘膜アジュバント活性を示すことが多くの論文で報告されており、血中抗体のみならず粘膜抗体の誘導が感染防御に有効である感染症に対して有効な非侵襲的投与経路として期待されているが、そのメカニズムについては活性を欠いた無毒変異毒素や、B サブユニットを用いたアジュバント活性の報告もあることから、見解は一様ではない。研究代表者は、cAMP が免疫学的に Th2 反応への傾倒に関わっているセカンドメッセンジャーとされていることと、その下流には cAMP に応答して T 細胞の分化や活性化に関与しているとされる転写因子の cAMP response element binding protein (CREB) が存在することより、A サブユニットの活性は重要であると考えてきた。このことは研究代表者が LT やその変異毒素を用いたマウスでの免疫実験においてもそれを裏付けるような結果が得られている。そこで研究代表者は CT、LT のアジュバント活性における A サブユニットの活性の重要性を、cAMP を介した CREB の活性化という分子生物学的な観点で着目し、CT とその変異毒素及び CTB を用いて以下の解析を行った。

3. 研究の方法

【CT 及び CTB の発現及び精製】 CT 及び CTB 発現プラスミド (pBSK-CT 及び pBSK-CTB) は、SD 配列を含む CT 遺伝子全長または CTB 遺伝子を *V. cholerae* 569B 株ゲノム DNA を鋳型にして PCR にて増幅し、pBluescript II SK (+) の LacZ α 遺伝子内に挿入して作製した。無毒変異 CT (E112Q) は pBSK-CT を鋳型にして Site-directed mutagenesis を用いて作製した。各 CT 及び CTB の発現は各プラスミドを大腸菌 MV1184 株に形質転換し、リンコマイ

シンを含む CAYE 培地で培養後、菌体破碎抽出液からガラクトースゲルでアフィニティ精製を行い、さらにホロ毒素については Free CTB のコンタミネーションを除去する目的で、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより精製を行った (図 1)。

(図 1)



【アジュバント活性の比較】 CT、E112Q 及び CTB を卵白アルブミン (OVA) と混合してマウスに 2 週間間隔で 2 回経鼻免疫後、2 週間後に採血し、抗 OVA 抗体を ELISA で測定した。

【キナーゼのリン酸化の半定量】 マウスより脾細胞さらには T 細胞と B 細胞を分離し、それぞれについて各 CT で処置した後に作製した細胞破碎液を元に、抗リン酸化 CREB 及び Total CREB 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。上流キナーゼの関与については各種キナーゼ阻害剤で前処置後、毒素処理を行った試料を作製し、CREB リン酸化の阻害を評価した。

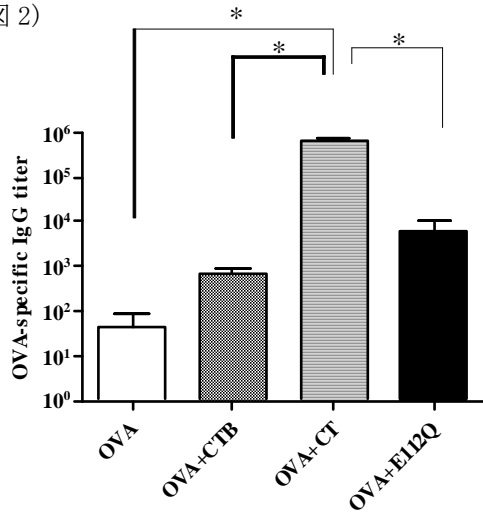
【リンパ球への毒素の結合解析】 ビオチン標識した CT 及び CTB をマウス脾臓より Dynabeads を用いて分離した T 及び B 細胞とそれぞれ反応させ、Per CP 標識ストレプトアビジンと結合後、フローサイトメトリー解析した。

【サイトカインの定量】 各 CT で免疫したマウスから脾細胞を調製した後、各 CT で刺激し、培養上清中のサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF) を CBA キットまたは ELISA により測定した。

4. 研究成果

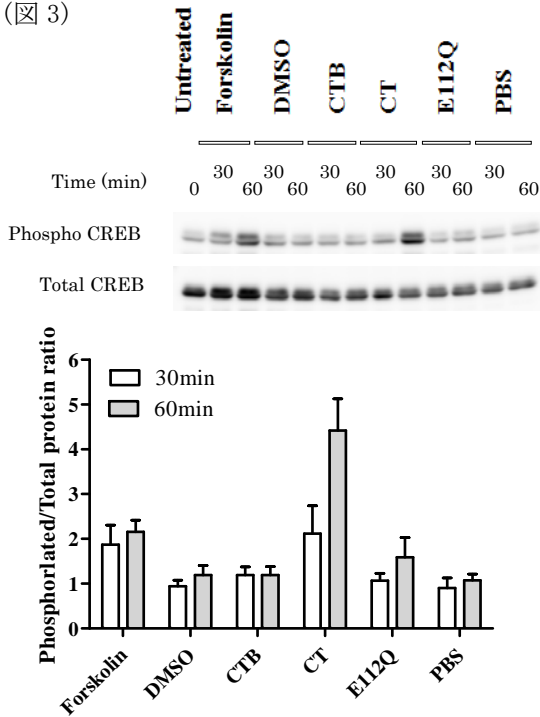
(1) CT によるアジュバント活性における cAMP の関与の有無を調べるため、Wild type の CT と E112Q 及び CTB を、OVA を抗原としてマウスに経鼻免疫し血中 OVA 抗体価を調べたところ、LT の場合と同様に、CT との混合免疫群が他群と比較して有意に高い抗体価を示したことから、cAMP の活性が重要であると考えられた (図 2)。

(図 2)

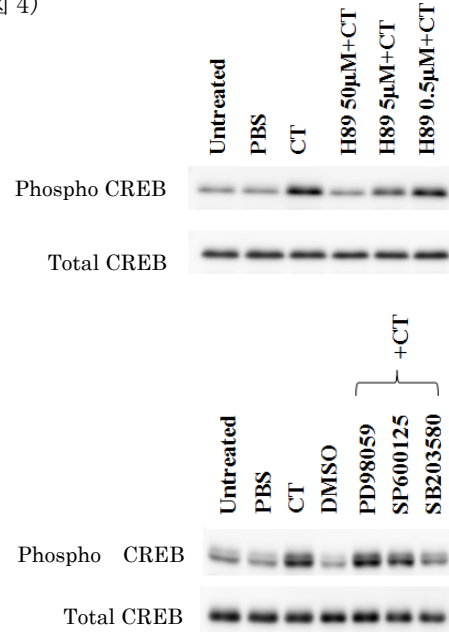


(2) このことより、cAMP の下流に存在し、T 細胞の分化やサイトカイン産生の調節に関与することが報告されている CREB の活性化についてマウスの脾細胞を調製し、各 CT で刺激して調べたところ、刺激 60 分後に Wild type CT でのみ CREB の強いリン酸化シグナルが認められた (図 3)。さらに関与する CREB の上流シグナルを特定するため、脾細胞を各種キナーゼインヒビターで前処置した後 CT で処置したところ、H89 及び SB203580 で処置した細胞で CT によるリン酸化が阻害されたことより、プロテインキナーゼ A (PKA) または p38 MAP キナーゼ経路が存在することが明らかとなった (図 4)。また、脾細胞より分離した T 細胞と B 細胞について解析しても同様の結果が認められた。

(図 3)

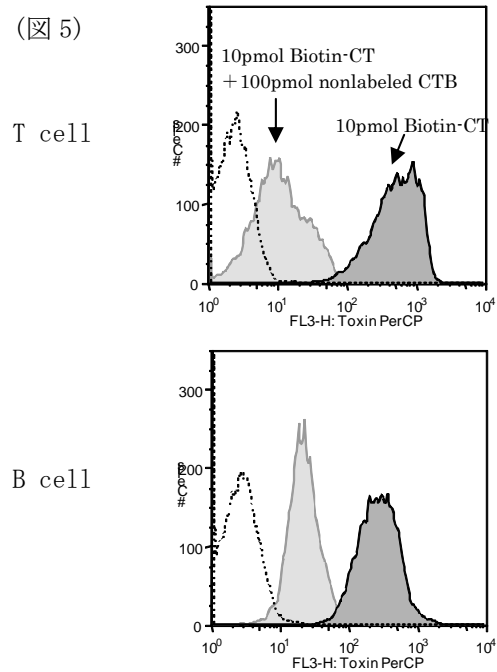


(図 4)



(3) CT による脾臓 T 細胞と B 細胞における CREB のリン酸化が、CT の直接相互作用によるものを調べるために、ビオチン標識 CT を作用させたところ、いずれも未標識 CTB の過剰量添加によって阻害される強い結合が見られた (図 5)。また GM1 非結合変異 CT (G33D) は CREB のリン酸化を起こさなかったことより、CT による CREB 活性化シグナルには CTB と GM1 の結合は必須であり、その後取り込まれた CTA の酵素活性によってシグナルを誘導していることが明らかとなった。

(図 5)



(4) 各 CT をマウスに経鼻免疫した後、採取した脾臓細胞を各 CT や CTB で 2 次刺激した時のサイトカインの産生を調べたところ、Wild type CT を基礎免疫したマウスでの脾細胞の 2 次刺激応答は CT または E112Q でのみ高く産生されたが、E112Q で基礎免疫したマウスでは CT、E112Q のいずれの 2 次刺激においてもあまり誘導されなかった。この 2 次応答における PKA-CREB、p38-CREB の活性化経路の関与を調べるため、H89 や SB203580 でこれらのメモリー脾細胞を前処理したのちに CT や、E112Q で刺激した際のサイトカイン産生抑制の有無を調べたが、明らかな抑制は見られなかった。CT による CREB の活性化は免疫初期の免疫記憶の形成に関わっているのかもしれない。

(5) 上記で示した結果は、CT による cAMP 経路を介した CREB のリン酸化がアジュバント活性に何らかの影響を与えている可能性を示唆するが、直接の証明には至らなかった。このためには CREB 遺伝子のノックダウンモデルを作製し、*in vitro* 及び *in vivo* による CT の活性の抑制の証明が必要である。現在、株化細胞モデルを検討しており、ヒト T 細胞株である Jurkat E6.1 がマウス脾細胞と同様のリン酸化の挙動を示した。本細胞は IL-2 産生株であることより、CREB 遺伝子のノックダウンまたはドミナントネガティブ変異 CREB 遺伝子を導入することにより、CT による CREB リン酸化とアジュバント活性の関連を解析できる可能性があり、現在その細胞株の作製を行っている。

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 4 件)

- ① Hirai K., Arimitsu H., Umeda K., Yokota K., Shen L., Ayada K., Kodama Y., Tsuji T., Hirai Y., Oguma K. (2010) Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera. *Acta Med Okayama*. 64(3):163-70. 査読有
- ② Ochi S., Shimizu T., Ohtani K., Ichinose Y., Arimitsu H., Tsukamoto K., Kato M., Tsuji T. (2009) Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. *DNA Res*. 16(5):299-309. 査読有
- ③ Arimitsu H., Tsukamoto K., Ochi S., Sasaki K., Kato M., Taniguchi K.,

Oguma K., Tsuji T. (2009) Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 67(2):96-103. 査読有

- ④ Sakaguchi Y., Hayashi T., Yamamoto Y., Nakayama K., Zhang K., Ma S., Arimitsu H., Oguma K. (2009) Molecular analysis of an extrachromosomal element containing the C2 toxin gene discovered in *Clostridium botulinum* type C. *J Bacteriol*. 191(10):3282-91. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 有満秀幸、コレラ毒素によるマウス脾臓細胞の CREB 活性化シグナル伝達経路の解析、第 57 回トキシシンポジウム、2010 年 7 月 16 日、滋賀県長浜市
- ② Arimitsu H., Construction of over-expression and purification system of cholera toxin and its mutants in *Escherichia coli*
44th Joint Meeting and Conference of the United States-Japan Panel on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. 2009 年 10 月 12-14 日、米国サンディエゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有満 秀幸 (ARIMITSU HIDEYUKI)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：40367701