

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590526

研究課題名(和文) ウエルシュ菌 毒素の分子生物学及び細胞生物学的解析による作用機構の解明

研究課題名(英文) Cellular mechanism of toxicity of Clostridium perfringens iota-toxin

研究代表者

小林 敬子 (Kobayashi, Keiko)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：90170315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウエルシュ菌のイオタ毒素は、致死、壊死活性を有し本菌による腸性中毒症の原因と考えられている。本毒素は、アクチンをADP-リボシル化するIaと細胞への結合に關与するIbからなる。本研究では、イオタ毒素の細胞レベルでの作用を解析した。イオタ毒素を細胞に作用させると、Ibが細胞膜でオリゴマーを形成しこれにIaが結合して侵入、初期エンドソーム、後期エンドソーム、そして、リソソームの順に輸送されることが判明した。Ibは単独では生物活性を示さないと考えてられていたが、IbはA431細胞の細胞膜でオリゴマーを形成し、ATP低下を誘導して細胞死を引き起こし、Ib単独で作用することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens iota-toxin is a binary toxin composed of an enzyme component(Ia) and a binding component(Ib). Each component alone lacks toxic activity, but together they produce cytotoxic effects. This study indicated that an internalized Ia and Ib complex was delivered to early endosomes and that subsequent delivery of Ia to the cytoplasm occurred mainly in early endosomes. Then, Ib was transported to late endosomes and lysosomes for degradation. Next, we examined the cytotoxicity of Ib. A431 and A549 cells were susceptible to Ib. Ib bound and formed oligomers in the membranes of A431 cells. Then, Ib caused cell swelling and the rapid depletion of cellular ATP in the cells. Ib also induced permeabilization by propidium iodide without DNA fragmentation in the cells. Ultrastructural studies revealed that A431 cells underwent necrosis after treatment with Ib. We demonstrated that Ib by itself produced cytotoxic activity through necrosis.

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：ウエルシュ菌イオタ毒素 エンドサイトーシス 初期エンドソーム リサイクリングエンドソーム 後期エンドソーム リソソーム

1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌の産生するイオタ毒素は、致死、壊死活性を有し、本菌による高い致死率を示す動物の腸性中毒症の原因毒素と考えられている。我々のグループではこれまでイオタ毒素の構造と機能について検討を行ってきた。本研究の目的は、本毒素の作用機構を解明するため、第一に、細胞への侵入経路であるエンドサイトーシスの過程を解析すること、第二にイオタ毒素の特異的なレセプターを探索すること、第三に本毒素による細胞内情報伝達の変化を明らかにすること、第四として、イオタ毒素の立体構造を解明し、その構造と機能を明らかにすることである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、イオタ毒素の細胞レベルでの作用を明らかにし、さらに、毒素の三次元構造や分子レベルでの作用機構を解明し、本感染症の発症メカニズムを明らかにすることである。このようなイオタ毒素を総合的に解析する研究は、国内外でほとんど例がなく、二成分毒素の作用機構解明に大きく寄与し、さらに、本感染症克服の糸口を得る。

3. 研究の方法

イオタ毒素の作用メカニズムを明らかにするため、以下に示す方法で解析を行う。

1)イオタ毒素のエンドサイトーシスによる侵入：Ibは、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入するが、いくつかの経路が想定されている。そこで、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームのマーカであるGFP-Rab5, GFP-

Rab7, GFP-Rab11をトラスフェクトした細胞を用いて、Ibの輸送を免疫蛍光染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で解析する。

2)イオタ毒素のIbの毒性の測定：Ib単独での作用を調べるため、A431細胞を使用して検討した。この細胞へのIbの結合を、抗Ib抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。さらに、IbによるDNAの変化、細胞へのPIの取り込み、ミトコンドリアに対する障害作用を解析した。Ib処理A431細胞の電子顕微鏡による解析も行った。

3)Ibの大量発現と精製：ウエルシュ菌から得ることが困難であったIbは、大腸菌でGST-fusionベクターを用いて比較的大量に得られることが可能となった。そこで、Ibの大腸菌の組換え体の培養と精製を繰返し、Ibを大量に精製する。得られたIbは、その立体構造の解明に使用する。

4)Ibの結晶化：前年までに、大量に得られた精製Ibを使用して種々の条件で結晶化のスクリーニングを行い、Ibの安定な結晶化を試みる。Ibの安定な結晶が得られれば、X線解析装置にかけ、その構造のリファインメントを行い、構造を明らかにする。

4. 研究成果

本研究ではイオタ毒素について検討を行い、細胞への侵入経路であるエンドサイトーシスの過程を解析、Ib単独での毒性発現、そして、Ibの大量精製と結晶化を行った。イオタ毒素は、Ibが細胞膜に結合後、これにIaが結合して、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入することが知られている。Ibの細胞内侵入経路をエンドサイトーシスのマーカとの局在で共焦点レーザー顕微鏡を使用して観察した。Ibは免疫蛍光染色により検出すると15分までは、Ibは初期エンドソームマーカであるGFP-Rab5との共存が認められた。30分では、1部は、後期エンドソームであるGFP-Rab7とマージし、残りはリサイクリングエンドソームのマーカであるGFP-Rab11と共存した。30分以降では、IbはLysosome-GFPとの局在が認められた。すなわち、初期エンドソームまで輸送されたIbの一部は、リサイクリングエンドソームを介して細胞表面に輸送され、再び、Iaと結合して細胞内に侵入すること、その後、Ibは、リソソームまで輸送され、分解されることが明らかとなった。Ibは、単独では生物活性を示さないと考えられていたが、我々は、IbがA431細胞に対して、swellingと細胞死を誘導することを初めて明らかにした。この時、IbによるDNAの断片化は認められず、PIの細胞への取込みが確認された。さらに、Ibは、ミトコンドリアからのチトクロームCの遊離やBaxとBatの活性化を誘導し、ミトコンドリア障害を示すことを明らかにした。Ib処理したA431細胞の電子顕微鏡写真は、典型的なネクローシスが認められた。以上より、Ibは、単独で細胞障害を引き起こし、感染拡大に関与する可能性が考えられる。

次に、Ibの大量発現と精製を行った。Ibは、ウエルシュ菌からは微量しか産生されず、大量に得ることが困難であった。我々は、Ib遺伝子を使用して大腸菌でGST-fusionベクターを用いて、精製したところ、比較的大量に得られることが可能となった。

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 9件)

1. *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. Masahiro Nagahama, Akiko Ohkubo, Masataka Oda, Keiko Kobayashi, Katsuhiko Amimoto, Kazuaki Miyamoto, and Jun Sakurai. **Infect. Immun.** 79(2), 905-910 (2011)

2. Cellular vacuolation induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. Cellular vacuolation

induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. Masahiro Nagahama, Yukari Itohayashi, Hideki Hara, Masahiro Higashihara, Yusuke Fukatani, Teruhisa Takagishi, Masataka Oda, Keiko Kobayashi, Ichiro Nakagawa, Jun Sakurai, **FEBS J.**, 278, 3395-3407(2011).

3. *Clostridium perfringens* iota-toxin b induces rapid cell necrosis. Masahiro Nagahama, Mariko Umezaki, Masataka Oda, Keiko Kobayashi, Shigenobu Tone, Taiji Suda, Kazumi Ishidoh, and Jun Sakurai, **Infect. Immun.** 79(11), 4353-4360 (2011)

4. Recent insights into *Clostridium perfringens* alpha-toxin. Masahiro Nagahama, Masataka Oda, Sadayuki Ochi, Keiko Kobayashi, Jun Sakurai. **Res. Adv. Infect. Immun.** 1, 1-12(2011)

5. *Clostridium perfringens* alpha-toxin induces the release of IL-8 through a dual pathway via TrkA in A549 cells. Masataka Oda, Ryota Shiihara, Yuka Ohmae, Michiko Kabura, Teruhisa Takagishi, Keiko Kobayashi, Masahiro Nagahama, Masahisa Inoue, Tomomi Abe, Koujun Setsu, Jun Sakurai. **Biochim. Biophys. Acta**, 1822(10), 1581-1589 (2012)

6. Intracellular trafficking of *Clostridium perfringens* iota-toxin b. Masahiro Nagahama, Mariko Umezaki, Ryo Tashiro, Masataka Oda, Keiko Kobayashi, Masahiro Shibutani, Teruhisa Takagishi, Kazumi Ishidoh, Mitsunori Fukuda, Jun Sakurai. **Infect. Immun.** 80(10), 3410-3416 (2012)

7. *Clostridium perfringens* alpha-toxin recognizes the GM1a-Trk A complex. Masataka Oda, Michiko Kabura, Teruhisa Takagishi, Ayaka Suzue, Kaori Tominaga, Shiori Urano, Masahiro Nagahama, Keiko Kobayashi, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa, Jun Sakurai. **J. Biol. Chem.** 287(39), 33070-33079 (2012)

8. A recombinant carboxy-terminal domain of alpha-toxin protects mice against *Clostridium perfringens*. Masahiro Nagahama, Masataka Oda, Keiko Kobayashi, Sadayuki Ochi, Teruhisa Takagishi, Masahiro Shibutani, Jun Sakurai. **Microbiol. Immunol.** 57, 340-345 (2013)

9 The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against *Clostridium perfringens* beta-toxin Masahiro Nagahama, Masahiro Shibutani, Soshi Seike, Mami Yonezaki, Teruhisa Takagishi, Masataka Oda, Keiko Kobayashi, Jun Sakurai.

Infect. Immun. 81(10), 3703-3708 (2013)

[学会発表](計30件)

1. *Clostridium perfringens* Tpel glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. Masahiro Nagahama, Akiko Ohkubo, Masataka Oda, Keiko Kobayashi, Katsuhiko Amimoto, Kazuaki Miyamoto, Jun Sakurai. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress、(札幌市) 2011年9月6-16日

2. ウエルシュ菌イオタ b 成分の細胞毒性の解析. 小林敬子、梅崎真理子、小田真隆、櫻井純、永浜政博. 第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会(岡山市) 2011年10月22-23日.

3. ボツリヌス菌 C2 毒素の細胞内侵入経路の解析. 高田奈央, 樋口真美, 小田真隆, 小林敬子, 櫻井純, 永浜政博. 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, (高松市) 2011年11月12-13日.

4. ウエルシュ菌 毒素の空胞形成機構の解析. 南俊宏, 高岸照久, 小田真隆, 小林敬子, 櫻井純, 永浜政博. 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(高松市) 2011年11月12-13日.

5. 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. 田代遼, 神林彩香, 小田真隆, 小林敬子, 櫻井純, 永浜政博. 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(高松市) 2011年11月12-13日.

6. ウエルシュ菌イオタ Ib 成分の細胞毒性の検討. 小林敬子, 梅崎真理子, 田代遼, 小田真隆, 櫻井純, 永浜政博. 文科省戦略的研究基盤形成支援事業『有機合成と天然物化学の手法による医薬品素材の開発』, 第 7 回研究発表会(徳島) 2011年12月22日.

7. ボツリヌス菌 C2 毒素の細胞内侵入機構の検討. 高田奈央, 樋口真美, 小田真隆, 小林敬子, 櫻井純, 永浜政博. 文科省戦略的研究基盤形成支援事業『有機合成と天然物化学の手法による医薬品素材の開発』, 第 7 回研究発表会(徳島) 2011年12月22日.

8. ウエルシュ菌 毒素の MDCK 細胞に対する空胞形成機構の解析 永浜政博, 高岸照久, 小田真隆, 小林敬子, 櫻井純, 第 85 日本細菌学会総会(長崎) 2012年3月27-29日.

9. ウエルシュ菌イオタ b 成分の細胞毒性機

構の解析 小林敬子, 梅崎真理子, 小田真隆, 櫻井純, 永浜政博, 第 85 日本細菌学会総会 (長崎) 2012 年 3 月 27-29 日.

10. Vizantin による自然免疫活性化メカニズム 小田真隆, 樽井敬史, 亀山直哉, 白川大起, 屋比久賢太, 小林敬子, 櫻井純, 永浜政博, 第 59 回トキシシンポジウム (帯広) 2012 年 7 月 6-7 日.

11. ウエルシュ菌イオタ Ib 成分の A431 細胞毒性機構の解析 小林敬子, 田代遼, 小田真隆, 宮本和明, 永浜政博, 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (徳島) 2012 年 10 月 20-21 日.

12. ウエルシュ菌 毒素の毒性発現におけるガングリオシド GM1a の役割 小田真隆, 高岸照久, 渋谷昌弘, 鈴江綾佳, 小林敬子, 櫻井純, 永浜政博, 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (徳島) 2012 年 10 月 20-21 日.

13. TDCM 誘導体 (Vizantin) の活性発現メカニズム 渋谷昌弘, 小田真隆, 樽井敬史, 小林敬子, 中野真代, 山本博文, 今川洋, 西沢麦夫, 櫻井純, 永浜政博, 第 51 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 (松江) 2012 年 11 月 10-11 日.

14. セレウス菌による致死とスフィンゴミエリナーゼの関係 藤田葵, 小田真隆, 清家総史, 加藤良子, 小林敬子, 永浜政博, 第 51 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 (松江) 2012 年 11 月 10-11 日.

15. ウエルシュ菌 毒素と TrkA/GM1a との相互作用の解析 高岸照久, 小田真隆, 蕪道子, 鈴江綾佳, 小林敬子, 櫻井純, 永浜政博, 第 51 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 (松江) 2012 年 11 月 10-11 日.

16. ウエルシュ菌 毒素による毒性発現と GM1a /TrkA 複合体のクラスター化 高岸照久, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博, 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉) 2013 年 3 月 18-20 日.

17. 腸管病原性ウエルシュ菌 F5603 株に存在するβ-ケリリシ遺伝子保有プラスミドについて. 宮本和明, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博, 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉) 2013 年 3 月 18-20 日.

18. Vizantin の感染症治療薬への応用. 渋谷昌弘, 小田真隆, 小林敬子, 櫻井純, 永浜政博, 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉) 2013 年 3 月 18-20 日.

19. ウエルシュ菌イオタ毒素 Ib 成分の A431 細胞に対する細胞毒性の解析 森川斉, 田代遼, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博, 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013 年 3 月 27-30 日.

20. 敗血症由来レリ菌による致死とスフィンゴミエリナーゼの関係. 藤田葵, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博, 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013 年 3 月 27-30 日.

21. ボツリヌス菌 C2 毒素の細胞内侵入における TrkA の役割. 柏崎奨太, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013 年 3 月 27-30 日.

22. ウエルシュ菌 毒素による THP-1 細胞の細胞障害作用. 米崎真未, 渋谷昌弘, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013 年 3 月 27-30 日.

23. ウエルシュ菌 TpeL による MDCK 細胞の F アクチン形成促進作用. 木内祥仁, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013 年 3 月 27-30 日.

24. Mode of action of *Clostridium perfringens* iota-toxin. ○Jun Sakurai, Masahiro Nagahama, Keiko Kobayashi. 他 4. European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX16) (Germany) June, 2013.

25. ウエルシュ菌 毒素のオリゴマー形成におけるリン脂質代謝の役割. 高岸照久, 名尾三佳, 高松輝実, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博, 第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (広島県呉市) 2013 年 10 月 12, 13 日

26. ウエルシュ菌 毒素 Ib 成分の細胞障害作用の解析 田代遼, 森川斉, 高岸照久, 小林敬子, 永浜政博, 第 52 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 (松山) 2013 年 10 月 26, 27 日.

27. ウエルシュ菌 毒素の細胞障害作用における MAPK の役割 清家総史, 米崎真未, 高岸照久, 小林敬子, 永浜政博, 第 52 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 (松山) 2013 年 10 月 26, 27 日.

28. Role of the MAPK pathway in the cellular responses to *Clostridium perfringens* beta-toxin. ○Masahiro Nagahama, Soshi Seike, Teruhisa Takagishi, Keiko Kobayashi. 第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2013 年 12 月 3-6 日.

29. ウエルシュ菌 毒素のオリゴマー形成における中性スフィンゴミエリナーゼの関与. 高岸照久, 名尾三佳, 高松輝実¹, 小田真隆, 小林敬子, 永浜政博. 第 87 回日本細

菌学会総会（東京）2014年3月26-28日.

30. ウエルシュ菌イオタ毒素 lb 成分の細胞への結合と侵入の検討. 田代 遼、森川齊、小林敬子、宮本和明、永浜政博. 第 87 回日本細菌学会総会（東京）2014年3月26-28日.

〔図書〕(計 0 件)

〔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 小林敬子
(1)

研究者番号：90170315

(2) 研究分担者 永浜政博
(1)

研究者番号：40164462

(3) 連携研究者
()

研究者番号：