

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460526

研究課題名(和文)ADP-リボシル化毒素Cholixの宿主受容体を介した毒性発現機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of Cholix cytotoxicity via its receptor.

研究代表者

八尋 錦之助(Yahiro, Kinnosuke)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80345024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ菌の産生する、新規ADP-リボシル化毒素 Cholix は、eEF2 をADP-リボシル化し細胞死を誘導する。我々は、炎症性サイトカインの添加がヒト肝臓細胞由来 HepG2 細胞のCholix の細胞毒性の亢進を見出した。その細胞致死機構の亢進には、MAPK, AMPK, PKC 等の種々のシグナル伝達機構が関与していることが明らかとなった。更に、受容体を同定するため、新たにCholix のペプチド抗体を作成した。この抗体を用いた免疫沈降で2種類の膜蛋白質を同定した。マス解析により同定を試行したが、同定に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cytotoxic effect of Cholix on HepG2 cells in the presence or absence of an inflammatory cytokine. Cytotoxicity of Cholix was dramatically enhanced with a cytokine in HepG2 cells. The mechanism of Cholix-induced cell death was involved in the signal transduction of MAPK, PKC or AMPK. In addition, we made a new peptide antibody for Cholix to identify the receptors on cell surface by immunoprecipitation. After biotin-labeled cell lysates were incubated with Cholix in the presence of anti-cholix peptide antibody, Cholix interaction proteins were detected by Western blotting using avidin-HRP. We observed two bands, which proteins were analyzed by TOF-MS/MS analysis. However, we could not identify these proteins. Now, we collect these bands to analyze again.

研究分野：細菌学

キーワード：毒素 サイトカイン 受容体 細胞死

様式 C-19, F-19, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コレラ菌由来外毒素 Cholix toxin (Cholix) は、ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有し、ヒト由来株化細胞 HeLa 細胞に炎症性カスパーゼを起点としたアポトーシスを誘導する。これまでの研究で、Cholix がヒト細胞へ侵入する際は、未同定の受容体を介すること、更に、種々の炎症性サイトカイン産生を誘導することで細胞致死を亢進させることを見出した。

2. 研究の目的

Cholix のマウスへの腹腔内投与は、致死性の肝臓障害を引き起こす。この障害機構は不明であることから、本研究は、ヒト肝臓細胞における新規な毒素受容体の同定、炎症性サイトカインによって亢進される細胞致死機構の全容を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Cholix の精製

pGEX-6P1 に Cholix をコードする遺伝子を組み込み、GST 融合型 Cholix を発現させた。GST を切断し、精製 Cholix を得た。更に、活性中心に変異を入れた E581A を同様に作成、精製しコントロールとして使用した。

(2) Cholix のペプチド抗体の作成

抗原として Cholix の中央部分 (315-331 aa) と C 末端部分 (648-661 aa) をウサギに免疫し、抗 Cholix ペプチド抗体を作成した。

(3) 免疫沈降法

HepG2 細胞の表面蛋白質をビオチン標識した後、RIPA 溶液で可溶化後、遠心し、上清を回収した。3 μ g Cholix あ

るいは熱失活させた Cholix を上清と混ぜた後、抗 Cholix ペプチド抗体 (C-末端側) Protein G agarose を加え、免疫沈降し、Avidin-HRP による ウェスタンブローディングにより検出した。

(4) 遺伝子導入

HepG2 細胞を用い、種々の siRNA とコントロール (NC) siRNA を Dharmafect 4 (Dharmacon) により遺伝子導入し、24-48 時間後、標的蛋白質の発現をウェスタンブローディングにより確認した。

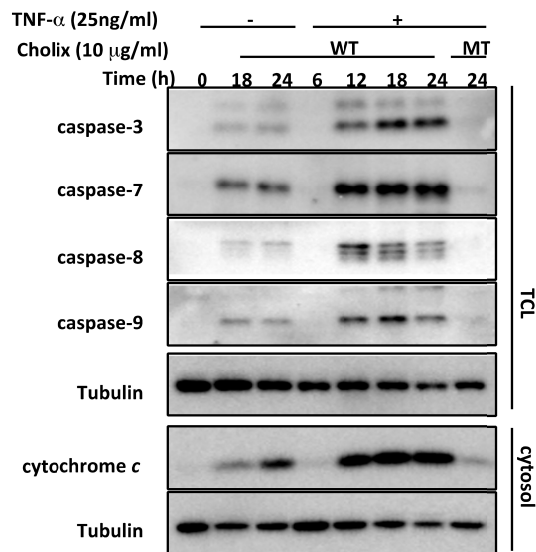
(5) Cholix による PARP 切断への各種阻害剤の影響

アポトーシスのマーカー蛋白質としてカスパーゼの活性化、PARP の切断をウェスタンブローディングで確認した。Cholix のアポトーシス誘導に關与するシグナル伝達系を明らかにするため、種々の阻害剤を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞致死機構の解析

HepG2 細胞に Cholix のみを作用させた場合、他の細胞で認められた致死作用が非常に弱いことが明らかとなった。つまり、補助的な因子が肝細胞への障害活性に必須であると推察された。そこで、ある種々の炎症性サイトカインを Cholix と共に添加した所、TNF- α の添加により劇的にカスパーゼの活性化、PARP の切断、細胞致死活性の著明な亢進を確認した (下図)。活性のない Cholix と供した場合にはこのような活性が認められないことから、Cholix の eEF2-ADP リボシル化が引き金となり、炎症性サイトカインのシグナル伝達と共同で作用することで細胞死を誘導したと考えられる。



次に、Cholix を作用させた HepG2 からどのようなサイトカインが分泌誘導されているかサイトカインプロットにより解析した結果、TNF- α は Cholix を作用させた HepG2 細胞からは分泌されておらず、好中球遊走因子が強く誘導されていた。

そこで、THP-1 細胞をマクロファージに分化させた細胞と HepG2 細胞を共培養し、Cholix を添加し、HepG2 細胞の PARP の切断を解析した。興味深いことに、Cholix の添加は、マクロファージ様 THP-1 細胞から TNF- α を誘導し、HepG2 細胞の PARP の切断亢進を誘導した。

次に、TNF- α の添加による Cholix の劇的な PARP の切断亢進機構を明らかにするため、種々の阻害剤を用い解析した。Cholix を添加した HepG2 細胞の MAPK 活性 (p38, ERK, JNK) は、TNF- α の添加の有無にかかわらず活性化していた。これら MAPK の特異的阻害剤の添加は、Cholix/TNF- α による PARP の切断を抑制した。

次に、過去の報告から、TNF- α が宿主細胞に ROS を誘導することが知られている。そこで、ROS の影響を調べた。

Cholix/TNF- α の細胞への添加は、HepG2 細胞中のグルタチオンの濃度を減少させた。更に N-アセチルシステイン (NAC) は、Cholix/TNF- α による PARP の切断を抑制した。また、NAC の添加は、Cholix により活性化する p38 のリン酸化を有意に阻害した。しかし、Cholix に強い感受性を持つ HeLa 細胞では、Cholix による PARP の切断は NAC では阻害できなかった。以上の結果から、Cholix による細胞致死機構は ROS を介した MAPK の活性化が関与しており、この致死機構は組織特異性があることが示唆された。

現在、この MAPK 以外のシグナル伝達機構を更に詳細に解析しており、どの点が Cholix による細胞死増強に関与しているか明らかにする予定である。

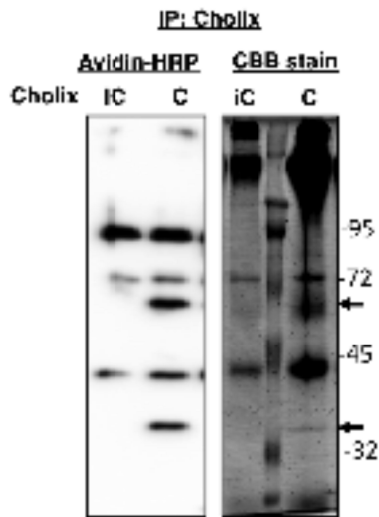
(2) ペプチド抗体の評価

作成した2種類の抗 Cholix ペプチド抗体は EILSA 評価において、1/32000 希釈でも有意な測定値を有す、抗体価の高い抗体であることが判った。ウエスタンブローディングにおいては、1/2000 希釈で Cholix に特異的に反応することが判った。しかし、免疫染色では、細胞に結合・侵入した Cholix と特異的な反応は認められなかった。

(3) 受容体の同定

当初、Cholix の末端に His-tag 等を付加し、受容体を回収できるか試行したがうまくいかなかった。そこで、新たに作成した抗 Cholix ペプチド抗体(C-末端)を用いて免疫沈降実験を行った。結果、下図に示すように、熱失活した Cholix (iC) では認められず、Cholix(C) でのみ検出される分子量約 65-kDa, 34-kDa の二つの

バンドを見出した。免疫沈降物を濃縮し、CBB 染色後、矢印の部分のバンドを切り出し、マス解析に供した。



解析結果から、幾つかの膜蛋白質が候補として見出された。候補抗体を用いて、免疫沈降物をサンプルにウエスタンブロットングにより、目的のサイズの蛋白と反応するか調べたが、何れも反応しなかった。免疫沈降物を濃縮したことで、夾雑物も多く含まれ、目的の蛋白の同定に至らなかったと考えている。

現在、夾雑物が少なくなるように精製方法を確立している最中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 小倉康平、八尋錦之助、秋山徹、野田公俊「*Vibrio cholerae* Cholix induces hepatocyte cell death through ROS production and MAPKs activation」第89回日本細菌学会総会 大阪国際交流センター(大阪・大阪市)2016年3月23-25日
2. 小倉康平、寺崎泰弘、秋山徹、八尋錦之助、野田公俊「コレラ菌由来 ADP-リボシル化毒素 Cholix toxin による肝細胞障害機構」第63回トキシシンポジウム ほほえみの宿、滝の湯(山形・天童市)2016年7月14-15日

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

八尋 錦之助 (YAHIRO, Kinnosuke)

千葉大学・医学研究院・准教授

研究者番号: 80345024

(2)連携研究者

小倉 康平 (OGURA, Kohei)

国立国際医療センター研究所・博士研究員

研究者番号: 00586612