

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460552

研究課題名(和文) ウエルシュ菌 毒素の細胞障害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of Clostridium perfringens beta-toxin-induced cytotoxicity

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：C型ウエルシュ菌の毒素は、致死や壊死活性を有し、ヒトの壊疽性腸炎の原因の1つと考えられている。毒素は細胞膜で7量体のオリゴマーを形成し、細胞死を引き起こす。今回、毒素をTHP-1細胞に作用させると細胞死を誘導し、オリゴマーを形成した。本毒素は、細胞内K⁺イオン遊離作用を示し、本毒素の細胞死と結合はK⁺フリー液中で認められ、高K⁺液中では抑制された。毒素はp38MAPKのリン酸化を示し、このリン酸化はK⁺フリー液で増強された。MAPK阻害剤でp38MAPKのリン酸化は阻害され、細胞毒性は増強された。以上の検討から、p38MAPKのリン酸化は、本毒素の障害作用に抑制的に働くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens beta-toxin is an important agent of necrotic enteritis and enterotoxemia. Beta-toxin is a pore-forming toxin (PFT) that causes cytotoxicity. We investigate the role of the MAPK pathways in the toxic effect of beta-toxin. In THP-1 cells, beta-toxin formed oligomers on lipid rafts in membranes and induced the efflux of K⁺ from THP-1 cells. The phosphorylation of p38 MAPK and JNK occurred in response to an attack by beta-toxin. p38 MAPK and JNK inhibitors enhanced toxin-induced cell death. Incubation in K⁺-free medium intensified p38 MAPK activation and cell death induced by the toxin, while incubation in K⁺-high medium prevented those effects. While streptolysin O (SLO) reportedly activates p38 MAPK via reactive oxygen species (ROS), we showed that this pathway did not play a major role in p38 phosphorylation in beta-toxin-treated cells. Therefore, we propose that beta-toxin induces activation of the MAPK pathway to promote host cell survival.

研究分野：細菌学

キーワード：ウエルシュ菌 毒素 THP-1細胞 細胞毒性 p38MAPK

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、壊疽性腸炎の原因であるC型ウエルシュ菌毒素による細胞障害の分子機構を毒素・宿主の両方から解明することである。毒素は免疫系細胞など特定の細胞に対して障害を示すが、その作用メカニズムと病原性との関連は明らかにされていない。本研究では、毒素の細胞レベルでの障害作用は不明であった。我々は、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明らかにした。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に結合してオリゴマーを形成し、作用することを報告した。一方、本毒素の感染における細胞障害に関しては全く未解決である。

2. 研究の目的

本研究では、毒素の細胞レベルでの障害作用、毒素の構造からのアプローチ、そして、*in vivo*での毒素の病理組織学的検討などから、毒素の作用機構を明らかにする。以上から、毒素の細胞障害の分子メカニズムと感染における役割を解明する。今回の検討は、これまでの研究の経緯を踏まえ、毒素による細胞障害と病原性における役割を解明することにより、本菌による宿主攻撃のストラテジーが明らかとなり、治療や予防への応用が期待される。

3. 研究の方法

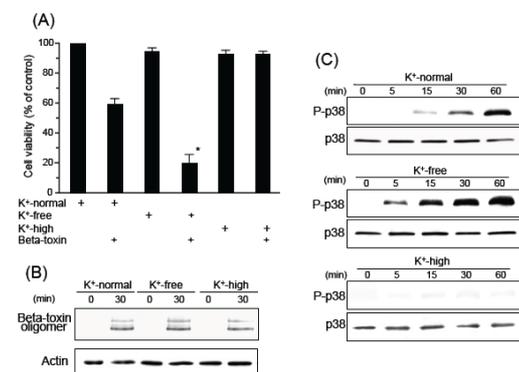
- 1) 毒素の細胞障害メカニズム：本毒素がいずれのシグナル伝達系を活性化して、細胞障害や炎症を誘導するかを細胞レベルで明らかにする。
- 2) 毒素に対する宿主抵抗因子：本毒素による宿主障害時に、p38MAPKがどのように働くかを検討し、毒素と宿主間の分子機構(攻防)を明らかにする。

4. 研究成果

毒素をTHP-1細胞に作用させると用量依存的な細胞膨化、すなわち、swellingを示し細胞死を誘導した。毒素による細胞膜障害を明らかにするため、細胞からのK⁺イオン遊離を検討すると、本毒素は、時間と濃度に依存した細胞内K⁺イオン遊離作用を示した。さらに、毒素とTHP-1細胞をインキュベーションして、毒素のバンドを確認すると時間に依存して毒素のオリゴマー形成が認められた。本毒素のオリゴマーは、特に細胞膜上のラフト領域に多く認められた。PFTによる細胞障害は、外液のK⁺イオン濃度が高いと抑制、低いと促進されること、そして、PFTは、細胞内K⁺イオンの低下により、p38MAPKをリン酸化することが報告されている。そこで本毒素の

作用における細胞外液のK⁺イオン濃度の効果を検討した。図(A)に示す様に、K⁺フリー液(0 mM)、ノーマル液(2.7 mM)、そして、高K⁺液(80 mM)中の細胞に対する毒素の作用を調べると、本毒素によるTHP-1細胞の膨化活性は、ノーマル液での作用と比較して、K⁺フリー液中では膨化活性が強く現れ、一方、高K⁺液中では膨化作用を示さず抑制された。一方、毒素のオリゴマー形成はノーマル液とK⁺フリー液中では認められたが高K⁺液では毒素の結合とオリゴマー形成が抑制された(図B)。以上の結果から細胞外K⁺イオン濃度が低い場合は、毒素によるK⁺遊離が促進され作用が増強されると考えられる。次に、図(C)に示す様に、毒素によるTHP-1細胞のp38MAPKのリン酸化を検討すると、約15-60分でp38MAPKのリン酸化が認められた。本毒素によるp38MAPKのリン酸化に対する細胞外K⁺イオン濃度の効果を検討すると、ノーマル液と比較してK⁺フリー液において増強が認められた。また、MAPK阻害剤であるSB203580処理により毒素による、p38MAPKのリン酸化は阻害され、さらに本毒素による細胞毒性は増強された。以上の検討から、p38MAPKのリン酸化は、本毒素の障害作用に抑制的に働くと考えられる。

以上より、β毒素モノマーがTHP-1細胞の細胞膜上に結合し、細胞膜を移動してラフトに集積して、7量体のオリゴマーとなり、ポアを形成する。その結果、細胞内のK⁺イオンの流出が誘導され、この細胞内K⁺イオン濃度の低下が引き金となり、宿主細胞の防御機構の一つであるp38MAPKが活性化され、その結果、細胞は膜の修復や生存シグナルが働き毒素の作用に抵抗することが明らかになった。すなわちp38MAPKはβ毒素の毒性に抵抗因子として働くことが判明した。



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 16 件)

- 1) S, Seike, M. Takehara, M. Nagahama, et al. *Clostridium perfringens* delta-toxin induces rapid cell necrosis. *PLoS one* 11, e0147957 (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0147957. 著者 5 人中 5 番目、査読有り
- 2) Oda M, Terao Y, Sakurai J, Nagahama M Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Toxins* 7, 5268-5275 (2015), doi: 10.3390/toxins7124880.
- 3) M. Nagahama, S. Seike, H. Shirai, et al. Role of P2X7 receptor in *Clostridium perfringens* beta-toxin-mediated cellular injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 2159-2167 (2015) doi: 10.1016/j.bbagen.2015.08.011 著者 7 人中 1 番目、査読有り
- 4) K. Miyamoto, S. Seike, M. Nagahama, et al. Identification of the replication region in pBCNF5603, a bacteriocin-encoding plasmid, in the enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strain F5603. *BMC Microbiol.* 15, 118 (2015) doi: 10.1186/s12866-015-0443-3.
- 5) M. Nagahama, A. Ohkubo, Y. Kinouti, et al. *Clostridium perfringens* TpeL induces the formation of stress fibers via activation of RhoA-ROCK signaling pathway. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 732-739 (2015) doi: 10.1248/bpb.b14-00842. 著者 7 人中 1 番目、査読有り
- 6) M. Nagahama, S. Ochi, M. Oda et al. Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins* 7, 396-406 (2015) doi: 10.3390/toxins7020396. 著者 6 人中 1 番目、査読有り
- 7) T. Takagishi, M. Oda, M. Nagahama, et al. *Clostridium perfringens* alpha-toxin induces GM1a clustering and TrkA phosphorylation in the host cell membrane. *PLoS one* 10, e0120497 (2015), doi: 10.1371/journal.pone.0120497. 著者 12 人中 12 番目、査読有り
- 8) M. Oda, H. Imagawa, M. Nagahama, et al. Novel inhibitor of bacterial sphingomyelinase, SMY-540, developed based on three-dimensional structure analysis. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 29, 303-310 (2014) doi: 10.3109/14756366.2013.777717. 著者 11 人中 11 番目、査読有り
- 9) M. Oda, H. Yamamoto, M. Nagahama, et al.

Vizantin inhibits endotoxin-mediated immune responses via the Toll-like receptor 4/MD-2 complex. *J. Immunol.* 193, 4507-4514 (2014) doi: 10.4049/jimmunol.1401796. 著者 20 人中 14 番目、査読有り

10) M. Nagahama, C. Takahashi, K. Aoyanagi K, et al. Intracellular trafficking of *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Toxicon* 82, 76-82 (2014) doi: 10.1016/j.toxicon.2014.02.009. 著者 8 人中 1 番目、査読有り

11) M. Nagahama. Vaccines against *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14, 913-917 (2013)

12) M. Nagahama, M. Shibusaki, S. Seike, et al. The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Infect. Immun.* 81, 3703-3708 (2013) doi: 10.1128/IAI.00579-13. 著者 8 人中 1 番目、査読有り

13) M. Nagahama, M. Oda, K. Kobayashi, et al. A recombinant carboxy-terminal domain of alpha-toxin protects mice against *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol.* 57, 340-345 (2013) doi: 10.1111/1348-0421.12036. 著者 7 人中 1 番目、査読有り

14) H. Yamamoto, M. Oda, M. Nagahama, et al. Concise Synthesis of a Probe Molecule Enabling Analysis and Imaging of Vizantin. *Chem. Pharm. Bull.* 61, 452-459 (2013) 著者 16 人中 11 番目、査読有り

15) T. Tsurumura, Y. Tsumori, M. Nagahama, et al. Arginine ADP-ribosylation Mechanism Based on Structural Snapshots of Iota-toxin and Actin Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 4267-4272 (2013). doi: 10.1073/pnas.1217227110. 著者 8 人中 8 番目、査読有り

16) M. Oda, A. Fujita, M. Nagahama, et al. *Bacillus cereus* sphingomyelinase recognizes ganglioside GM3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 164-168 (2013) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.002. 著者 7 人中 6 番目、査読有り

〔学会発表〕(計 18 件)

- 1) 永浜政博, 竹原正也, ウエルシュ菌 delta 毒素の細胞毒性メカニズムの解析. 日本薬学会 第 136 年会(横浜)2016 年 3 月 26-29 日
- 2) 並川恵, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素の細胞毒性発現における Panx1 チャネルの役割. 第 89 回日本細菌学会総会(大阪)平成 28 年 3 月 23-25 日

3) 竹原正也, 永浜政博, ウエルシュ菌 \square 毒素の好中球分化抑制による自然免疫系の障害. 第 89 回日本細菌学会総会(大阪)2016 年 3 月 23-25 日

4) 清家総史, 高岸照久, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素の細胞毒性機構の検討. BMB2015(神戸市)2015 年 12 月 1-4 日

5) 竹原正也, 高岸照久, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素の好中球産生障害による宿主感染機構. 第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会(岡山市)2015 年 10 月 3,4 日

6) S. Seike, T. Takagishi, M. Nagahama, *Clostridium perfringens* delta-toxin induces rapid cell. 9th International conference on the molecular biology and pathogenesis of the clostridia. Freiburg, Germany, Sept 7-11, 2015.

7) 清家総史, 高岸照久, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素の細胞毒性に対する P2X7 レセプターの役割の検討. 第 62 回 毒素シンポジウム(三重県志摩市)2015 年 7 月 8-10 日

8) 清家総史, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素の毒性発現と P2X7 レセプターの関係. 日本薬学会 第 135 年会(神戸)2015 年 3 月 25-28 日

9) 榎間絢子, 清家総史, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素の毒性発現における Pannexin-1 の役割. 第 88 回日本細菌学会総会(岐阜)2015 年 3 月 26-28 日

10) 清家総史, 永浜政博, ウエルシュ菌 \square 毒素の毒性発現における P2X₇ レセプターの役割. 第 67 回日本細菌学会中国・四国支部総会(徳島市)2014 年 10 月 4,5 日

11) 高岸照久, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素のオリゴマー形成機構の解析. 第 61 回毒素シンポジウム(鳴門市) 2014 年 9 月 3-5 日

12) 高岸照久, 永浜政博, 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役割. 日本薬学会 第 134 年会(熊本)2014 年 3 月 27-30 日

13) 清家総史, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素の細胞毒性に対する P2X7 レセプターの役割. 第 87 回日本細菌学会総会(東京) 2014 年 3 月 18-20 日

14) 永浜政博, 清家総史, Role of the MAPK pathway in the cellular responses to *Clostridium perfringens* beta-toxin. 第 36 回日本分子生物学会年会(神戸)2013 年 12

月 3-6 日

15) 清家総史, 永浜政博, ウエルシュ菌 毒素の細胞障害作用における MAPK の役割. 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

16) 高岸照久, 永浜政博, 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. 第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会(呉市) 2013 年 10 月 12,13 日

17) 小田真隆, 永浜政博, 敗血症患者由来セレウス菌の病原性発現とスフィンゴミエリナーゼの関係. 第 60 回毒素シンポジウム(兵庫県宍粟市) 2013 年 7 月 17-19 日

18) J. Sakurai, M. Nagahama, Mode of action of *Clostridium perfringens* iota-toxin. European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX16) June 22-26, 2013, Freiburg, Germany

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab/lab09/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: