

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660223

研究課題名(和文)炭疽菌毒素細胞質内侵入に関わる膜輸送制御機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms on intracellular invasion of anthrax toxins

研究代表者

廣井 豊子 (HIROI, TOYOKO)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：30305643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：炭疽菌毒素受容体を発現しているヒト由来培養細胞(HeLa細胞およびHUVEC)を用いて、炭疽菌毒素の細胞内侵入に関わるシグナル因子の探索を行った。本研究では、ヒト細胞内の膜・小胞輸送や細胞骨格を制御する低分子量GTPase群などのシグナル因子などに注目し、炭疽菌致死毒素LeTx処理後の種々の細胞内因子のmRNA発現量の変動、およびシグナル因子タンパク質の発現量変化細胞を用いたLeTx処理などの検討を実施した結果、ダイナミンに依存しない侵入系経路の存在および低分子量GTPaseであるARF及びその関連因子、更に発現調節因子であるKLFが炭疽菌毒素の細胞内侵入に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We searched for the signaling factors which are involved in cellular invasion and intracellular translocation of anthrax toxin by using HeLa cells and HUVEC, which dominantly express anthrax toxin receptor TEM8 and CMG2, respectively. In this study, we focused our interest on signal molecules such as GTPase related with intracellular membrane trafficking and cytoskeletal regulation, and performed mRNA array and toxin treatment to the cells which modified protein expression of signaling molecules. Our data demonstrated that the possibility that anthrax toxin enter the cell via dynamin-independent pathway, and ARF-related molecules and KLF are involved in cellular invasion of anthrax toxin.

研究分野：病原性細菌の病原性発現の分子機序解明

キーワード：病原性細菌 細菌毒素 バイオテロ 人獣共通感染症 GTPase 細胞内膜・小胞輸送 細胞分子生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 炭疽（炭疽菌感染症）対策の必要性

炭疽菌は、家畜やヒトに急性経過をとる致死性の高い炭疽（症）を発症させる人獣共通感染症起因菌として、獣医学領域、公衆衛生学領域で最も重要な病原性細菌の一つである。日本は現在、炭疽非流行地域（発生は散発）だが、世界的には中国、モンゴル、インド、トルコ、パキスタン、メキシコ、チリなど蔓延地域や流行地域が多く、日本においても継続した防疫対策が不可欠である。さらに炭疽菌は、土壌に存在し比較的培養が容易である事、高い感染力・致死率・安定性を有する事から生物兵器として最も利用しやすい危険度3の病原体と考えられており、バイオテロ対策としての炭疽の発症予防および治療薬の開発が国家安全対策として必要とされている。

(2) 炭疽発症の機序

炭疽菌は、病原因子として感染防御抗原（PA）、浮腫因子（EF）および致死因子（LF）を産生分泌し、これら病原因子複合体（LF-PA複合体、EF-PA複合体）が炭疽菌毒素（致死毒素及び浮腫毒素）としてヒトを含めた動物の細胞内に侵入し、炭疽を発症させる。この炭疽菌毒素の細胞内侵入は、PAが動物やヒトの細胞の表面に存在する膜蛋白質 TEM8 および CMG2 に対して親和性を有し、これら膜蛋白質に結合する事に始まる。従って、炭疽菌毒素受容体（ATR）は、TEM8 および CMG2 であると報告されている。続いて、PA-ATR 複合体の PA に、EF あるいは LF が結合することで、細胞膜上で炭疽菌毒素-ATR 複合体（EF-PA-ATR, LF-PA-ATR）が形成される。この炭疽菌毒素-ATR 複合体は、クラスリン依存性エンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、その後、炭疽菌毒素-ATR 複合体を含むエンドゾームにリソソームが融合し内部の酸性化が起こる。小胞内の酸性化が刺激となり PA の構造的変化が生じ、小胞膜に PA による孔形成が起き、生理活性をもつ EF 及び LF が細胞質内に移動可能となる。細胞質内に移動した EF および LF は、それぞれの酵素活性によって細胞内の正常な機能を変調あるいは阻止し、炭疽が発症する。このように、炭疽菌毒素の毒性作用発現は「エンドサイトーシスによる細胞内侵入」と「エンドゾームとリソソームの融合」という宿主細胞

の膜・小胞輸送に強く依存している。

(3) 炭疽（炭疽菌感染症）対策の現状

ウシ及びウマなどの動物の炭疽予防には、無荚膜ワクチン株が生菌ワクチンとして用いられ、病獣は治療対象とはならずすべて淘汰される。一方、ヒトに対する炭疽予防には、PA成分ワクチンが米国や英国で実用化されているが、PA成分ワクチンの使用対象は研究者、獣医師、軍関係者に限られ、またその使用は炭疽菌暴露前に制限されている。その投与方法および副作用の点で問題が多く、日本では承認されていない。従って、現時点においてバイオテロ対策として広く一般市民に用いる事が可能な有効予防策はない。また、ヒトに対する炭疽治療薬としては、通常、炭疽菌暴露後に抗生物質の投与が行われるが、これは炭疽菌排除を目的にしており、菌体から産生されてしまった炭疽菌毒素に対しては効力が全くない。これらの現状から、炭疽菌毒素に対する全く新しい機序での発症予防あるいは治療薬の開発が必要な状態である。

2. 研究の目的

致死性の高い炭疽でみられる諸症状は、炭疽菌毒素が宿主動物の細胞質内に侵入し引き起こされることから、毒素の細胞質内侵入阻止は、有効な炭疽発症予防/治療機序となりうると考えられる。加えて、これは既存の予防薬や治療薬とは異なる機序のため、必要に応じて既存薬との併用使用が可能と予想され、より高い効果が望める可能性が考えられる。炭疽菌毒素の細胞質内侵入は、宿主細胞の「膜・小胞輸送」システムに強く依存していることが明らかになっているが、一般的に宿主細胞の膜・小胞輸送には多くの因子が複雑に関与し、また複数の経路が存在することから、炭疽菌毒素が細胞質侵入する際の分子機序の詳細は、未だ解明されていない。本研究は、この炭疽菌毒素細胞侵入に関与する「膜・小胞輸送」を制御している GTPase とその活性調節因子の探索を行い、炭疽毒素の細胞質侵入機序の解明を行うとともに、膜・小胞輸送阻止による炭疽発症予防の可能性を探索する今後の検討の基礎となる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

概要

ヒト培養細胞の培地に、PA 単独あるいは PA と LF の混合液(致死毒素 LeTx)を加え、PA-ATR 複合体あるいは LeTx-ATR 複合体のエンドサイトーシスを誘導し、その時に mRNA 発現量に変動のある因子を探索した。これまでの検討から報告のある「膜・小胞輸送」システムにする GTPase 関連因子に加え、mRNA 量に変動のあったものを LeTx の細胞内侵入関連因子の候補因子とした。LeTx を用いた時は、LF の活性を測定して LeTx 侵入量とした。候補因子が LeTx の細胞侵入に関わるかどうかを確認するために、候補因子を過剰発現させた細胞、及び RNA 干渉により候補因子の発現を抑制した細胞を用いて、LeTx の細胞内移行を確認した。さらに、PA の細胞内移行に GTPase の酵素活性を必要とするかどうかを確認するため、活性改変型 GTPase を発現させた細胞を作成し、PA の細胞内移行を確認した。PA とともに LF を用い、LF の酵素活性を見る事で、毒素の細胞質内移行、つまりエンドゾームとリソソームの融合の有無を確認する。エンドゾームとリソソームの融合に関しては、これまでに一般的にエンドゾームとリソソームの融合に関与すると報告のある ARF8 や Rab などを中心に広く検討を行なった。

方法

(1) ヒト培養細胞を用いた実験系：ATR には TEM8 と CMG2 の 2 種類が存在し、細胞種によってその発現量が異なる。本実験では、TEM8 発現細胞として HeLa 細胞、CMG2 発現細胞として HUVEC を用いた。

(2) 炭疽菌毒素：市販されている炭疽菌病原因子 PA 及び LF (List Biological Lab)を実験に使用した。

(3) mRNA 発現量の変動：RT 2 Prolifer PCR Arrays を用いてスクリーニング後、個別に定量的 RT-PCR を行った。

(4) PA の細胞内への移行確認：Western blot 法による SDS 抵抗性 7 量体 PA の検出を行なった。

(5) LF の活性：LF の生理活性である MEK1 切断活性は、次のいずれかの方法で検出定量化した。

① MEK1 の N 末端を認識する抗体を用いた Western blot 法で MEK1 切断量を定量する方法

②リン酸化 ERK を認識する抗体を用いた Western blot 法でリン酸化 ERK 量を検出する方法。

(6) 野生型あるいは活性改変型の候補因子 GTPase の過剰発現細胞の作成：トランスフェクション法、あるいは nucleofection 法より強発現プラスミドを細胞に導入し行った。

(7) 発現抑制細胞の作成：候補因子に対する siRNA (市販の 4 種混合)を細胞にトランスフェクション法により導入、72 時間培養後十分に発現量が減少している事を確認し、毒素実験に使用した。(6) (7)ともに候補因子発現量の増加あるいは減少は、定量的 RT-PCR 法にて mRNA 量を、Western blot 法にてタンパク量を測定し、確認した。

4. 研究成果

主な研究成果を以下に示す。

(1) 細胞への PA および炭疽菌致死毒素 LeTx 処理の条件検討

毒素処理は、細胞培養液に LeTx を添加し、細胞を 37 °C での Incubation することで行った。毒素の細胞内侵入の同調化のために、37 °C での Incubation の前に 4 °C 30 分の結合時間を設定した。毒素処理後、経時的に細胞を回収し、LF の活性を測定した。毒素処理時間 0.5 時間で既に LF の活性が見られはじめたが、安定して十分高い LF 活性を検出するために、本試験では毒素処理時間は 37 °C 1-4 時間とした。

(2) 毒素処理で発現が変動する因子のスクリーニング

1 時間の LeTx 処理で、発現が変動する細胞内因子の探索を行った結果、毒素非処理群との比較で発現量が 2 倍以上上昇する因子を 12 種 (A-L)見いだした (表 1)。

表 1 炭疽菌致死毒素処理によって mRNA 発現量が変動した遺伝子

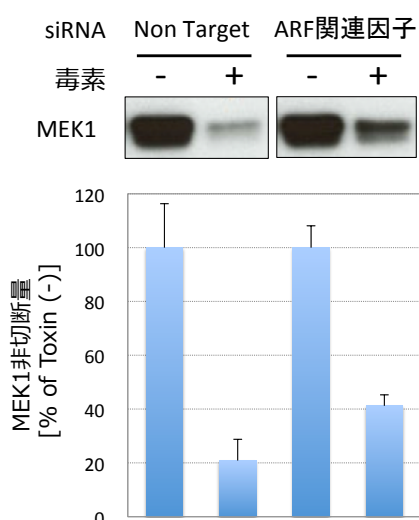
Change (Fold)	Gene ID	Function
7.4	A	RhoA GTPaseを制御・活性化
3.7	B	MAPKの活性化等に関与
2.9	C	細胞膜の波打ち運動に関与
2.6	D	Rho-like GTPasesの活性化
2.5	E	アクチン重合の制御や分裂に関与
2.4	F	アクチンの枝分かれ形成に関与
2.3	G	アクチン細胞骨格の構築等に関与
2.3	H	ミエリン構成タンパク質に関与
2.2	I	アクチンダイナミックを制御
2.2	J	細胞骨格の構築を制御
2.1	K	ARF6に結合し細胞膜波打ち運動に関与
2.0	L	ARF等のGTPaseを活性化

これらの12因子に、低分子量GTPaseの1群であるARFの関連因子が2つ含まれていた。これまでの検討では、炭疽毒素の細胞内侵入にARF群関連因子が関与している報告はなかった。ARFおよび関連因子は細胞膜付近に存在し、種々の膜輸送や細胞骨格制御に関わっている事が知られている。そのような因子が毒素処置により発現量が変化した事から、毒素細胞内侵入に直接的あるいは間接的に関わっている可能性が示唆されたため、この因子群に注目しさらなる検討を行なった。

(3) ARF 関連因子群の発現改変細胞を用いた検討

ARF 関連因子群が炭疽菌致死毒素の侵入に関与しているか否かを明らかにするため、RNA 干渉を利用して予めARF 関連因子の発現を抑制させた細胞を用い、毒素細胞侵入試験を行った。図1に示すように、陰性対象である非特異的なsiRNA (Non Target)で処理した細胞では、MEK1は細胞内に侵入した毒素で切断され、毒素非処理群の20%程度まで減少していた。しかしARF 関連因子の発現をあらかじめ正常の10%以下に抑制した細胞では、毒素処理後でのMEK1の切断量は減少し、より多く(毒素非処理群の40%程度)のMEK1が切断されずに残っていた。

図1 ARF関連因子発現抑制細胞での毒素によるMEK1 N末端切断量

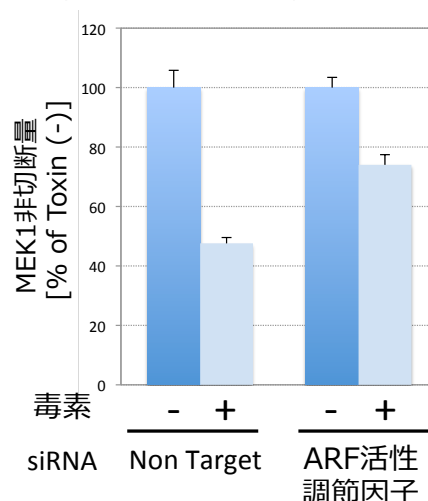


この結果よりこのARF 関連因子の発現は、毒素の細胞内侵入を促進している可能性が考えられた。

(4) ARF 活性調節因子の発現改変細胞を用いた検討

(3)でARF 関連因子の発現が毒素の細胞内侵入に促進的に作用している可能性が示唆されたため、続いてそのARF 関連因子の活性が毒素の細胞内侵入に関わっているかを検討した。図2に示すように、ARF 活性調節因子の発現を抑制した細胞を用いて毒素細胞侵入量を調べたところ、(3)同様、毒素によるMEK1の切断量が減少し、ARF 関連因子が毒素侵入に関わっている可能性が強く示唆された。

図2 ARF活性調節因子発現抑制細胞での毒素によるMEK1 N末端切断量



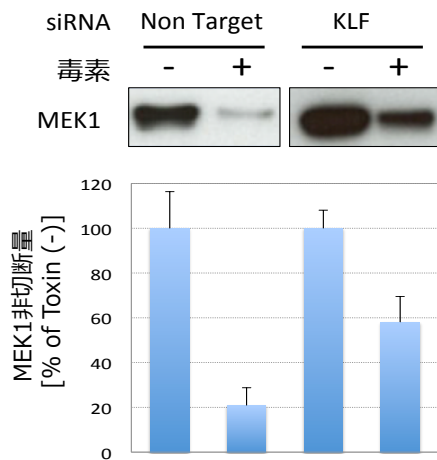
(5) KLFの発現改変細胞を用いた検討

KLFは転写調節因子として種々の蛋白の発現を調節している。本検討の実施者は、以前の種々の検討からKLFが菌体や毒素の細胞侵入時に変動する事を見いだしている事から、炭疽菌毒素の細胞内侵入においても、その量の変動や侵入機序に関与している可能性を考え、検討を行った。

図3に示すように、KLFの発現を抑制した細胞を用いて毒素細胞侵入量を調べたところ、毒素によるMEK1の切断量が減少し、KLFが毒素侵入に関わっている可能性が強く示唆された。

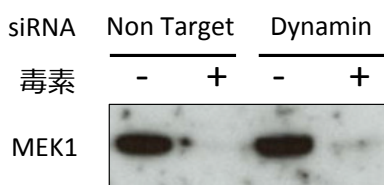
一方、この他に検討したRab群GTPaseなどの因子の発現量を改変した細胞では、毒素侵入量に大きな変化は見られなかった。

図3 KLF発現抑制細胞での毒素によるMEK1 N末端切断量



(6)ダイナミンの発現変化細胞を用いた検討
ダイナミンは、膜から小胞の分離に関与しているGTPaseの1種であり、エンドサイトーシスなど物質の取り込みの際には、ダイナミンに依存する経路と依存しない経路が存在する。これまでの報告から、炭疽菌毒素の細胞内侵入にはダイナミンが関与しているとされているが、近年ダイナミンの関与を疑う見解もある。そこで、ダイナミンの関与を確認するために、ダイナミンの発現量を有意に減少させた細胞で毒素侵入試験を行った。ダイナミン発現が十分に抑制されているにも関わらず、毒素は陰性対象群とほぼ同程度MEK1の切断が見られ、毒素が十分に細胞内に侵入している事があきらかとなった(図4)。この結果より、毒素の多くが、ダイナミン非依存的な経路で細胞内に入ってきている可能性が示唆された。

図4 Dynamin発現抑制細胞での毒素によるMEK1 N末端切断量



これらの結果から、炭疽菌の細胞内侵入に関わる因子として、ARF関連因子やKLFが見いだされた。また、従来から関与が言われていたダイ

ナミンは、その関与があまり大きくなく、ダイナミン非依存的な毒素侵入経路が存在する可能性が示唆された。今後更なる詳細な検討が必要ではあるが、これらの知見は、炭疽菌毒素の細胞内侵入にかかる詳細な機序の解明に大きく寄与するとともに、これらの因子を阻害し炭疽発症を抑制する新規方法の開発研究の足がかりになるものと考えられる。

(5) 主な発表論文等

現在のところなし。

(6) 研究組織

①研究代表者

廣井 豊子 (HIROI, Toyoko)
帯広畜産大学・畜産学部・准教授
研究者番号：30305643

②研究協力者

若山 裕巳 (WAKAYAMA, Yumi)
帯広畜産大学・大学院畜産学研究科・学生