

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790421

研究課題名(和文)：C型とD型ボツリヌス菌ホスホリパーゼCの三次元構造と機能解析

研究課題名(英文)：Combined analysis of tertiary structure and function(s) of *Clostridium botulinum* type C and D phospholipase C

研究代表者：

阪口 義彦 (SAKAGUCHI YOSHIHIKO)

宮崎大学・IR推進機構・助教

研究者番号：70403491

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス菌は、産生する神経毒素の抗原性の違いにより A～G 型に分類される。このうち、C 型と D 型菌はウエルシュ菌の重要な病原因子である毒素と類似の活性を示すホスホリパーゼ C (PLC) を産生する。今回、C 型と D 型菌のそれぞれの PLC 遺伝子の全塩基配列を決定した。得られた配列情報を基に、組換え C 型と D 型 PLC を発現・精製し、酵素活性(卵黄活性、溶血活性など)、生物活性(マウス致死活性)を測定した。

研究成果の概要(英文)： *Clostridium botulinum* cultures are classified into seven types, types A to G, based on the antigenicity of the neurotoxins produced. Of these seven types, only types C and D produce phospholipase C (lecithinase, PLC) in addition to the neurotoxin. Phospholipase of *C. perfringens* is known as  $\alpha$ -toxin, which is the best characterized of all clostridial phospholipases and is an important agent of gas gangrene. The toxin, which exhibits phospholipase C and sphingomyelinase (SMase) activities, causes hemolysis, necrosis, and death. Here we determined the PLC genes of *C. botulinum* type C and D (Cbot $\alpha$  and Dbot $\alpha$ ) by using inverse PCR and primer walking, and expressed as a GST-fusion protein. We compare the enzymatic and biological activities (egg-yolk activity, hemolysis, and mouse lethality) of the purified protein of *C. perfringens*  $\alpha$ -toxin, Cbot $\alpha$ , and Dbot $\alpha$ .

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ボツリヌス菌、ホスホリパーゼ C、ウエルシュ菌 毒素、卵黄活性、溶血活性、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌は世界で最も強力といわれている神経毒素を産生し、ヒトや家畜に強力な

致死作用を示す。本菌は産生する神経毒素の抗原性の違いにより、A～G型の7型に分類される。これらのうち、C型とD型菌のみホスホリパーゼC (PLC) を産生することを報告した。一方、ウエルシュ菌 毒素はガス壊疽の病原因子であり、PLCとスフィンゴミエリナーゼ (SMase)の2つの酵素活性を有している。毒素は370アミノ酸残基からなるタンパク質で、1～250残基のNドメインと251～370残基のCドメインに分かれ、Nドメインは触媒領域、Cドメインは血球や細胞への結合に關与する領域である。Nドメインには2つのZn<sup>2+</sup>と2価の金属イオン (Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>など) が存在する。また、毒素の構造維持や触媒作用、基質 (ホスファチジルコリン (PC), スフィンゴミエリン (SM)) との結合に重要な働きをするアミノ酸残基も明らかとされている。最近、我々は代表的なC型菌 (C-Stockholm, C-ST) とD型菌 (D-1873)のそれぞれのPLC遺伝子 (*plc*)の全塩基配列を決定した。アミノ酸レベルで、C-STとD-1873は98%とほとんど同じであり、C-STと 毒素は53%の相同性を示した。また、酵素活性に重要なZn<sup>2+</sup>結合モチーフであるアミノ酸残基もよく保存されていた。このことから、ボツリヌス菌PLCも病原性に關与していることが推察される。

C型とD型菌の中でもD-4947とD-SAIは、卵黄活性を示さない。これらの株について、CSTの*plc*をプローブとしてサザンブロット解析を行うと、いずれも強いシグナルが検出された。そこで、両株の*plc*の塩基配列を決定したところ、両株ともCSTのPLCとアミノ酸レベルで91%と高い相同性を示した。PLC遺伝子が存在するのにもかかわらず、卵黄活性を示さないことについても調べる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ボツリヌス菌PLCの酵素活性 (卵黄活性, 生物活性, 基質の特異性など), 生物活性 (マウス致死活性, 細胞毒性) を測

定し、毒素の活性と比較する。また、本酵素の結晶を作成し、構造解析を行い既知の毒素の構造と比較する。本酵素の活性に重要な領域とアミノ酸残基を解析し、その病原性における意義を解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) C型とD型菌 PLC 遺伝子 (*plc*)の塩基配列の決定

インバースPCRとプライマーウォーキング法の組み合わせにより、*plc*の全塩基配列の決定を行った。

(2) 組換えC型とD型PLC (Cbot, Dbot)の構築

Cbot またはDbot をGST融合タンパク質として発現するように遺伝子構築し、大腸菌で大量発現を行い精製した。

(3) 酵素活性と生物活性

1) 組み換えCbot とDbot の卵黄活性, 溶血活性 (ウサギ, ヒツジ) の酵素活性を測定した。

2) マウス (8週齢のBALB/c, 体重20～25g) の尾静脈内に 毒素, Cbot, Dbot をそれぞれ投与し、18時間の生死を観察した。

3) ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293細胞) またはイヌ腎尿管上皮細胞株 (MDCK細胞), 神経細胞モデルであるラット副腎髄質由来褐色細胞腫 (PC12細胞), ヒト単球由来白血病細胞 (THP-1細胞), サル腎臓細胞 (Vero細胞) のそれぞれの細胞に 毒素, Cbot, Dbot を添加し、37℃で16時間後の細胞の形態変化を観察した。

(4) 2) P C-またはS M-リポソームの破壊作用

5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF) を取り込ませたホスファチジルコリン (PC) またはスフィンゴミエリン (SM) のリポソームを作成し、その破壊作用 (リポソームから遊離するCF) を測定した。また、ウサギまたはヒ

ツジ赤血球膜, PC-またはSM-リポソームに対する毒素, Dbot の結合を調べた。

(5) PC-またはSM-リポソームの相互作用

LiposoFast (リポソーム粒子を均一化する装置) で処理したPC-またはSM-リポソームを Sensor Chip L1 (BIAcore) に固定させる。CaCl<sub>2</sub>で調製した毒素, Dbot を機械に注入し、Running buffer (0.15mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>) を流速5  $\mu$ l/min で行い、時間依存的にPC-またはSM-リポソームとの相互作用を分析し、BIAevaluation (解析ソフト) で親和性を解析した。

(6) 結晶化

ハンギングドロップ法に基づいて、シリコナイズ処理したカバーガラスに精製した組み換えDbot と母液 (30% (V/V) ポリエチレングリコール (PEG) とN-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸 (CAPS) (pH 10.5), 0.2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) をカバーガラス上で混ぜ合わせる。そして、母液を注入した24 ウェルプレートにカバーガラスの下側に酵素溶液がぶらさげた状態で被せる。その後、プレートを4 でインキュベーションし、顕微鏡で結晶の有無を観察した。

#### 4. 研究成果

種々の C 型ボツリヌス有毒株、C-468, C-203, C-CB19, C-6813, C-CD6F または D 型ボツリヌス有毒株、D-CB16 の PLC 遺伝子 (*plc*) の塩基配列を決定した。いずれの C 型と D 型 *plc* の塩基配列も 1,200-bp で、推定アミノ酸から 399 個のアミノ酸残基から構成されていた。毒素とはアミノ酸レベルで高い相同性を示し、酵素活性に重要である Zn<sup>2+</sup>結合モチーフもよく保存されていた。

以前に配列決定した C-Stockholm(C-ST) または D-1873 の PLC (Cbot, Dbot) を大腸菌で GST 融合タンパク質として大量発現・精製を行った。精製した Cbot と Dbot を用いて、酵素活性および生物活性を測定した。

Cbot と Dbot の卵黄活性は、いずれも 1mM CoCl<sub>2</sub>存在下で毒素と比べて 1/10 低い活性を示した。溶血活性においては、4mM CoCl<sub>2</sub>存在下でウサギ赤血球を用いた場合、毒素と比べて 1/1,000 低い活性を示したが、ヒツジ赤血球ではほとんど活性が認められなかった。ホスファチジルコリン (PC) -またはスフィンゴミエリン (SM) -リポソームの破壊作用においては、Dbot は毒素と比べ PC-リポソームでは 1/100、SM-リポソームでは 1/60 低い活性を示した。また、ウサギまたはヒツジ赤血球膜の結合を調べると、Dbot は毒素に比べて強い結合を示した。SM-または PC-リポソームを用いた場合でも同様であった。BIAcore 解析により、基質 (PC) と Dbot との親和性を調べたところ、Dbot は毒素に比べて PC に対する強い結合を示した。一方、マウスの致死活性では、Dbot は毒素に比べて 1/1,500 低い活性であった。Dbot の種々の細胞に対する影響を調べたが、いずれの細胞においても変化が認められなかった。従って、C 型と D 型菌 PLC は卵黄活性を示し、良く血球に結合するが、溶血および致死活性は毒素と比較して著しく低いことが結論された。

D-4947 または D-SA を培養し、遠心により菌体と培養上清に分けた。菌体を壊し遠心により得た上清について SDS-PAGE を行い、ウサギ抗 Dbot 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。卵黄活性を示す C 型および D 型菌 (C-ST, D-1873) では、推定した分子量 (46kDa) の位置シグナルを示したが、D-4947 と D-SA については、46kDa 以外に約 30kDa の位置にもシグナルが検出された。このことから、2 株については PLC を産生するが、菌体内のプロテアーゼにより分解を受けていることが推察された。

今後、既知の毒素の立体構造をもとに Dbot の構造解析を行い、酵素活性に重要なアミノ酸残基を調べ、クロストリジウム属の

病原性の解明に大いに貢献したいと考えている。

#### 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 2 件)

Murata, H., Sakaguchi, M., Jin, Y., Sakaguchi, Y., Futami, J., Yamada, H., Kataoka, K., Huh, NH., A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via MTORC2. J. Biol. Chem., 286(9), 7182-7189, 2011. 査読有

Yamamoto, K., Sakaguchi, M., Medina, R.J., Niida A., Sakaguchi, Y., Miyazaki, M., Kataoka, K., Huh, NH., Transcriptional regulation of a brown adipocyte-specific gene, UCP1, by KLF11 and KLF15. Biochem. Biophys. Res. Commun., 400(1), 175-180, 2010. 査読有

[学会発表](計 5 件) (うち招待講演 計 1 件)

阪口義彦, 小田真隆, Ni Nengah Dwi Fatmawati, 山本由弥子, 唐澤忠宏, 小林敬子, 永浜政博, 櫻井 純, 小熊恵二, ポツリヌス菌ホスホリパーゼCの酵素活性と生物活性, BMB2010, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 平成 22 年 12 月 7 日-10 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

阪口政清, 村田 等, 山本健一, 小野智之, 阪口義彦, 本山 晃, 日比野利彦, 片岡健, 許 南浩, 多機能受容体RAGEの下流信号伝達機構の解明, BMB2010, 第 33 回日本分子

生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 平成 22 年 12 月 7 日-10 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

山本由弥子, 張 凱, Ni Nengah Dwi Fatmawati, 申 蓮花, 馬 少博, 阪口義彦, 鈴木智典, 小熊恵二, A型ボツリヌス神経毒素の三叉神経節培養細胞への結合と取り込み, 第 63 回 日本細菌学会中国・四国支部総会, 平成 22 年 10 月 16 日-17 日, 松山大学(松山市)

阪口義彦, 小田真隆, Ni Nengah Dwi Fatmawati, 山本由弥子, 難波ひかる, 唐澤忠宏, 小林敬子, 永浜政博, 櫻井 純, 小熊恵二, ポツリヌス菌ホスホリパーゼCの酵素活性と生物活性, 第 57 回 トキシンシンポジウム, 平成 22 年 7 月 14 日-16 日, 長浜ロイヤルホテル(滋賀)

<招待講演>

阪口義彦, C型とD型ボツリヌス毒素を支配するバクテリオファージのゲノム解析, 第 3 回ファージ研究会, 平成 22 年 9 月 9 日-10 日, 大阪大学蛋白質研究所(大阪)

[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

阪口 義彦 (SAKAGUCHI YOSHIHIKO)

宮崎大学・IR 推進機構・助教

研究者番号：70403491

### (2)研究分担者

研究者番号：

### (3)連携研究者

研究者番号：