

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19590462
 研究課題名（和文） ウエルシュ菌β毒素の免疫系細胞の受容体-シグナル伝達系に対する作用機構の解析
 研究課題名（英文） Effect of *Clostridium perfringens* beta-toxin on receptor-signal transduction pathway of immune cells
 研究代表者
 永浜 政博 (Nagahama Masahiro)
 徳島文理大学・薬学部・准教授
 研究者番号： 40164462

研究成果の概要：ウエルシュ菌β毒素の免疫系細胞のシグナル伝達系に対する作用を検討すると、毒素は細胞膜の脂質ラフトに結合しオリゴマーを形成後、内因性ホスホリパーゼC(PLC)を活性化し、産生されたイノシトール3リン酸が細胞内Ca²⁺濃度を上昇させることが判明した。その後、Ca²⁺を介する一連のシグナル伝達系が働き、TNF-α遊離が促進する。すなわち、β毒素は、内因性PLCを活性化後、サイトカインの遊離や細胞毒性を誘導すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ウエルシュ菌、β毒素、THP-1細胞、ホスホリパーゼC、脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌の産生するβ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壊疽性腸炎の病原因子と考えられている。我々は、β毒素の構造と作用、そして、本感染症と毒素の関係の解明を試みてきた(*Toxin Rev.* 25,89(2006))。これまでに、我々は、β毒素の遺伝子配列を解明(*Infect.Immun.* 61, 3958(1993))し、β毒素分子中で活性に重要なアミノ酸残基を明らかにした(*BBA* 1454,97(1999))。さらに、本毒素をマウスに皮下投与①すると、一次知覚神経を刺激してサブスタンスP(SP)、TNF-αやヒスタミンの遊離を促進し、血管透過性を亢進することを報告した(*Br.J.Pharmacol.* 138,23(2003), *Br.J.Pharmacol.* 153,

1296(2008))。次に、我々は、β毒素がヒト急性前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞に強い毒性を示し、本毒素はHL-60細胞の細胞膜の脂質ラフトに結合してオリゴマーを形成することを明らかにした(*J.Biol.Chem.* 278, 36934(2003))。しかしながら、本毒素の作用発現機構に関しては全く未解決であるので、免疫系細胞に対する作用を検討した

2. 研究の目的

本研究の目的は、β毒素の作用を解明するためβ毒素が免疫系の細胞に対して分子レベルで、どのような作用を示すのか、免疫系細胞に存在する特異的なレセプターを探索、本毒素処理後のシグナル伝達の活性化機構

などを解明する。以上より、β 毒素の構造と機能が明らかとなり、本菌による宿主攻撃の戦略がわかり、発症機構の解明が期待される。

- (1) β 毒素の細胞レベルでの作用：β 毒素は免疫系細胞に障害作用を示すことから、種々の血液系細胞やリンパ球系の培養細胞に対する障害作用を検討し、免疫系細胞のいずれに最も作用するのかを細胞レベルで明らかにする。
- (2) β 毒素の分子レベルでの作用：β 毒素は、感受性細胞に対してカルシニューリンシグナル伝達系を活性化することを明らかにした。また、本毒素は細胞膜ラフトドメインに結合することを報告しているため、これらを手がかりにして細胞表面の主にラフトに存在すると考えられる特異的なレセプターを明らかにする。さらに、どのようなシグナル伝達系に関与する機能タンパク質分子が働くのかを明らかにし、分子レベルでの詳細な β 毒素の作用を解明する。

3. 研究の方法

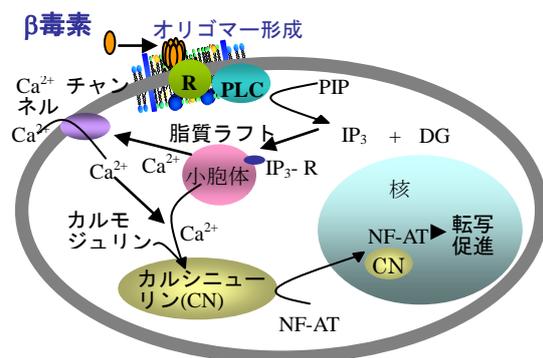
- (1) β 毒素の免疫系細胞に対する作用の解析：血液系培養細胞に対する β 毒素の細胞毒性、そして、ラフトへの結合を検討するため、³²Pラベル β 毒素のラフトへの結合を超速心機を用いた分子間相互作用解析装置（ベックマン社）や富士フィルムのイメージ解析システムを用いて解析する。さらに、ラフト、カベオラ、フロチリン、または、ストマチンなどのドメインが存在し、本毒素はいずれのマイクロドメインに作用するか検討する。
- (2) β 毒素の受容体-シグナル伝達系への作用：β 毒素の内因性PLCの活性化は、³²P-ATPを用いて生成した³²P-ホスファチジン酸量を測定して行った。β 毒素は、内因性PLCを活性化して細胞内Ca²⁺濃度を上昇させるので、細胞内Ca²⁺濃度の変化を細胞内Ca²⁺蛍光イメージングシステム（浜松ホトニクス社）を用いて解析する。毒素はカルモジュリン(CaM)-カルシニューリン(CN)シグナル伝達系を活性化するので、CNの毒素による活性化を測定した。

4. 研究成果

- (1) β 毒素の細胞レベルでの作用を明らかにするため、感受性細胞を用いて詳細な作用機構を検討した。種々の血液系の培養細胞に対する本毒素の細胞毒性の強さは、THP-1 細胞 > U937 細胞 > HL-60 細胞 > MOLT-4 細胞 > BALL-1 細胞の順であった。これら細胞に対する β 毒素の細胞膜ラフトへの結合を検討すると、本毒素の細胞毒性が強い細胞ほど、そのラフトへの毒素の結合とオリゴマー形成が強いことが判明した。
- (2) 本毒素のシグナル伝達系に対する作用を検討したところ、毒素は内因性ホスホリパーゼ C を活性化し、イノシトール 3 リン酸(IP3)

の生成が認められた。さらに、本毒素処理により、細胞内 Ca²⁺濃度の急速な増加が認められた。そこで、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇で、カルモデュリンを介して活性化されるカルシニューリン(CN)の活性を測定すると、毒素濃度に依存して活性化が認められた。一方、β 毒素の細胞毒性は、PLC、カルモデュリン、CN のそれぞれの阻害剤で有意に抑制された。次に、CN は活性化後、核内転写因子 NF-AT を核内に転移させサイトカインの mRNA の産生亢進を引き起こすことが知られているが、本毒素処理で、TNF-α の mRNA 増加と細胞外への TNF-α の遊離が認められた。以上の結果から、図 1 に示すように、β 毒素は、免疫系細胞のラフトでオリゴマーを形成し、レセプターの刺激を介して、PLC の活性化を誘導する。その結果、生成した IP3 により、小胞体からの Ca²⁺遊離と細胞外液からの Ca²⁺流入により細胞内の Ca²⁺濃度が上昇する。次いで、カルモデュリン-CN 系が活性化され、毒素の細胞毒性が惹起されると考えられる。同時に、TNF-α の mRNA 増加と遊離が認められた。すなわち、本毒素は、細胞に対して細胞毒性とサイトカイン遊離の 2 つの作用を有することが判明した。

図 1 β 毒素の細胞に対する作用



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 7 件)

① Masataka Oda, Masahiro Nagahama, Jun Sakurai. (著者 11 人、8 番目) 査読有
Effect of erythromycin on biological activities induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 327, 934-940 (2008)

② Hideaki Tsuge, Masahiro Nagahama, Jun Sakurai. (著者 9 人、2 番目) 査読有
Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota-toxin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 7399-7404 (2008)

③ Masahiro Nagahama, Aatsushi Kihara, Jun Sakurai. (著者 5 人、1 番目) 査読有
Involvement of tumour necrosis factor- α in *Clostridium perfringens* β -toxin-induced plasma extravasation in mice.

Br. J. Pharmacol. 153, 1296-1302 (2008)

④ Masataka Oda, Masahiro Nagahama, Jun Sakurai. (著者 10 人、8 番目) 査読有
The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin.

J. Lipid Res. 49, 1039-1047 (2008)

⑤ Keiko Kobayashi, Masahiro Nagahama, Jun Sakurai. (著者 8 人、1 と 2 番目) 査読有
Role of Ca^{2+} -binding motif in cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* iota-toxin.

Microb. Pathogen. 44, 265-270 (2008)

⑥ Masahiro Nagahama, Akiko Otsuka, Jun Sakurai. (著者 8 人、1 番目) 査読有
Effect of unsaturated bonds in the sn-2 acyl chain of phosphatidylcholine on the membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin toward liposomes.

Biochim. Biophys. Acta 1768, 2940-2945 (2007)

⑦ Tomomichi Matsuda, Masahiro Nagahama Shinya Tanaka. (著者 9 人、8 番目) 査読有
Enteritis necroticans 'pigbel' in a Japanese diabetic adult.

Pathol. Int. 57, 622-626 (2007)

[学会発表] (計 7 件)

① 永浜政博、ウエルシュ菌 ϵ 毒素の MDCK 細胞に対する ATP 涸渇と細胞毒性の解析、日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 26 日 (京都)

② 永浜政博、ウエルシュ菌 TpeL 毒素でグルコシル化される低分子量 G タンパク質の検討、第 82 日本細菌学会総会 2009 年 3 月 12-14 日 (名古屋)

③ 永浜政博、ボツリヌス菌 C2 毒素の細胞内輸送経路の解析、BMB200 2008 年 12 月 9-12 日 (神戸)

④ 大窪晶子、永浜政博、ウエルシュ菌 TpeL 毒素の細胞毒性機構の解析、第 20 回微生物シンポジウム (岐阜) 2008 年 9 月 3-4 日

⑤ 永浜政博、ウエルシュ菌 β 毒素のマウス皮

膚血管透過性作用と TNF- α の関係、日本薬学会第 128 年会 2008 年 3 月 26-28 日 (横浜)

⑥ 小林敬子、永浜政博、ウエルシュ菌イオタ毒素のイオタ a 成分とアクチンの結晶解析、第 81 日本細菌学会総会 2008 年 3 月 24-26 日 (京都)

⑦ 岩本 忍、永浜政博、ウエルシュ菌イオタ毒素のイオタ a 成分とアクチンの結合解析、第 54 回毒素シンポジウム 2007 年 9 月 5-7 日 (大阪府泉佐野)

[図書] (計 1 件)

櫻井純、小田真隆、永浜政博、医薬ジャーナル社、化学療法の領域 25 巻 5 号 6.細菌由来スフィンゴミエリナーゼの構造と機能、2009、p74-80.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

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・准教授
研究者番号：40164462

(2) 研究分担者

小林 敬子 (Kobayashi Keiko)
徳島文理大学・薬学部・助教
研究者番号：90170315

(3) 連携研究者