

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790401

研究課題名（和文）ADP-リボシル化毒素 Cholix の毒性発現制御

研究課題名（英文）Analysis of human cell death mechanism caused by ADP-ribosyltransferase Cholix toxin.

研究代表者

八尋 錦之助（YAHIRO KINNOSUKE）

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：80345024

研究成果の概要（和文）：*V. cholerae* の産生する ADP-リボシル化毒素 Cholix がヒト細胞に対して示す細胞致死活性を初めて明らかにした。つまり、本毒素による致死活性（アポトーシスあるいはネクローシス）は細胞種により異なっており、ヒト子宮上皮細胞由来 HeLa 細胞に対しては炎症性カスパーゼの活性化を起点としたミトコンドリア依存、非依存性の二つの経路を介したカスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導した。

研究成果の概要（英文）：Cholix toxin (Cholix) is a novel ADP-ribosyl transferase cytotoxin produced by *Vibrio cholerae*. Cell death pathway induced by eEF2-ADP-ribosylation differs in various cell types. Cholix-induced apoptosis in HeLa cells is dependent on caspase activation, which is regulated by both mitochondria-dependent and -independent pathways. In conclusion, inflammatory caspases and caspase-8 were responsible for both mitochondrial signals and other caspase activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：ADP-リボシル化毒素，アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

標的細胞のタンパク質伸長因子 eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) を ADP-リボシル化する外毒素として、

diphtheria toxin (DT) と *Pseudomonas* Exotoxin A (PEA) に加え、*Vibrio cholerae* 由来 Cholix toxin (Cholix) が近年同定された。eEF2 を ADP-リボシル化する外毒素は、

肝臓を主とする様々な器官に炎症を引き起こすことが知られており、その作用はタンパク質合成阻害によるストレスに起因すると言われている。

V. cholerae が持つ外毒素としては、G タンパク質を ADP-リボシル化する cholera toxin (CT) が広く知られているが、CT が *V. cholerae* 0-1 ならびに 0-139 血清型のみにより産生されるのに対して、Cholix の遺伝子は多くの菌株が保有している。Cholix は、*V. cholerae* における新たな病原因子の可能性がある。

2. 研究の目的

Cholix は、PEA と一次構造上の相同性を示すが (amino acid identity = 36%)、両毒素がヒト細胞に対して示す致死活性については、詳細に解明されていない。本研究は、*V. cholerae* の産生する Cholix がヒトに対して示す細胞致死活性の機序を明らかにすることを目的とし、ヒト HeLa 細胞をモデルとして用い Cholix による細胞致死における各種アポトーシスシグナルに関与するタンパク質の挙動 (チトクローム *c* の放出やカスパーゼの活性化など) を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア外膜ポア形成への影響の解析

ミトコンドリアは、膜透過性を増大させるポアを形成し、ミトコンドリア内タンパク質 (チトクローム *c* や apaf-1 等) を細胞外へと放出させることで下流のアポトーシスシグナル伝達を進行させる。外膜の透過性を調節する B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) タンパク質ファミリーは、アポトーシス抑制型ならびに促進型の両方を含むが、その内の Bak と Bax は、それ

らの構造を変化させることで外膜ポアを形成することが知られている。

本研究では、まず Cholix の作用により HeLa 細胞内で Bak ならびに Bax が構造変化を示すかを明らかにするため、両タンパク質の構造変化を免疫沈降法により解析した。次に、Bak ならびに Bax のアポトーシスへの寄与を調べるため、siRNA 遺伝子導入により Bak のみ、Bax のみ、あるいは Bak/Bax 両方をノックダウンさせた細胞に Cholix を作用させ、アポトーシスシグナルタンパク質の挙動に与える影響を解析した。

(2) カスパーゼ活性化の経路解析

カスパーゼは、炎症反応やアポトーシスに関わるシステインプロテアーゼの一群であり、N 末端側あるいは C 末端側の切断を受けることで活性化する。アポトーシスの初期段階、すなわちシグナル上流で活性化されたカスパーゼは、種々のシグナルを介して下流のカスパーゼを活性化させる。

本研究では、Cholix が引き起こすアポトーシスにおいて上流シグナルとして機能するカスパーゼを決定するために、全カスパーゼあるいは各カスパーゼ特異的な阻害剤を用い、各阻害剤がアポトーシスシグナルならびに細胞致死活性に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Cholix の HeLa 細胞に対する致死活性

Cholix は HeLa 細胞に対してアポトーシスを進行させ、作用後 12-18 時間で様々なカスパーゼ (3、6、7、8、および 9) の活性化やミトコンドリア内タンパク質チトクローム *c* の細胞質への放出等が検出された (図 1)。その後、作用後 21-24 時間での致死活性を示した。

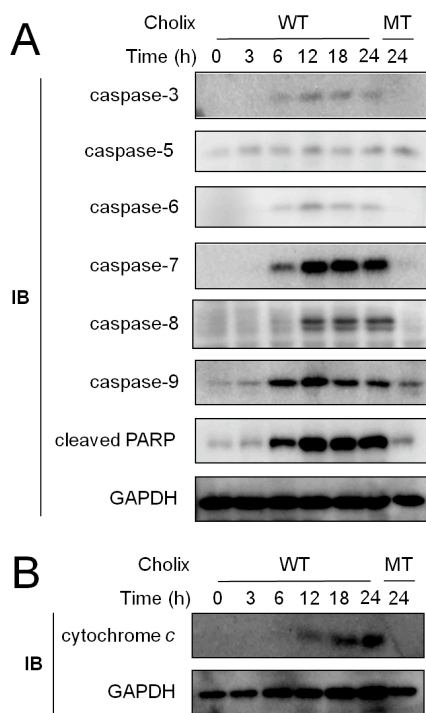


図 1. Cholix による HeLa 細胞内カスパーゼの活性化 (A) と チトクローム c の放出 (B)

(2) Bak/Bax の構造変化

ミトコンドリア外膜ポア形成に関わる Bcl-2 ファミリータンパク質 Bak ならびに Bax について、Bak あるいは Bax を認識する抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、Cholix 作用後 6-9 時間後に両タンパク質の構造変化が検出された。また両タンパク質は、構造変化に伴い互いに結合していることが明らかになった。このことから、Cholix の作用によるアポトーシス進行には、両タンパク質の構造変化ならびに結合が関与していることが明らかとなった。

(3) Bak/Bax のノックダウンによるチトクローム c 放出の抑制

Bak/Bax によるミトコンドリア外膜ポア形成とアポトーシスシグナル進行との相関を明らかにするために、siRNA 遺伝子導入により Bak のみ、Bax のみ、あるいは両タンパ

ク質をノックダウンさせた HeLa 細胞に Cholix を作用させた。その結果、チトクローム c の細胞質への放出は、ミトコンドリア内タンパク質 Bak ノックダウンにより抑制され、さらに両タンパク質のノックダウンによりさらに抑制された (図 2)。このことから、ミトコンドリア依存的なアポトーシスシグナルの進行は、Bak ならびに Bax により制御されていることが示された。

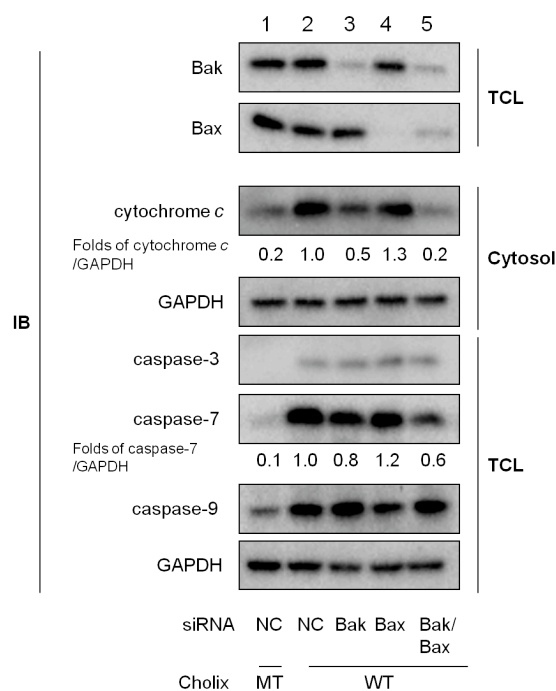


図 2. Bak/Bax ノックダウンがアポトーシスシグナルに与える影響

(4) Bak/Bax ノックダウンの細胞致死への影響

ミトコンドリア依存的なアポトーシスシグナル伝達は、Bak ならびに Bax のノックダウンにより抑制された。しかし、両タンパク質のノックダウンは、カスパーゼ 7 の活性化を抑制したが、カスパーゼ 3 や 9 の活性化は維持されたままで、致死活性は抑制されなかった (図 2)。このことから、Cholix を作用させた HeLa 細胞では、ミトコンドリア非依

存的なシグナルが進行していると考えられた。

(5) カスパーゼ依存的に進行するアポトーシス

Cholix を作用させた HeLa 細胞でのカスパーゼの役割を解析するために、全カスパーゼの活性を阻害したところ、カスパーゼの活性化ならびにチトクローム *c* の放出は抑制され、細胞致死活性が消失した (図 3)。このことから、Cholix による HeLa 細胞のアポトーシスは、カスパーゼ依存的に進行し、ミトコンドリア依存的ならびに非依存的なシグナル伝達の両方をカスパーゼが制御していることが明らかになった。

(6) カスパーゼ 8 による下流のカスパーゼならびにチトクローム *c* 放出の制御

ミトコンドリア依存的ならびに非依存的な経路の両方に寄与するカスパーゼは、アポトーシスの初期段階で活性化されると考えられる。そこで、各カスパーゼ特異的な阻害剤を用いて、そのカスパーゼが下流のシグナルに与える影響を解析した (図 3)。その結果、カスパーゼ 9 特異的な阻害剤ではカスパーゼ 3 や 7 の活性化を抑制したが、チトクローム *c* の放出は阻害されなかった。一方、カスパーゼ 8 特異的な阻害剤を添加した細胞では、カスパーゼ 3、7、および 9 の活性化を抑制し、また Bak/Bax の構造変化を抑制することでチトクローム *c* の放出を阻害していた。このことから、カスパーゼ 8 は、ミトコンドリア依存的ならびに非依存的なアポトーシスシグナル進行に関与していることが示唆された。

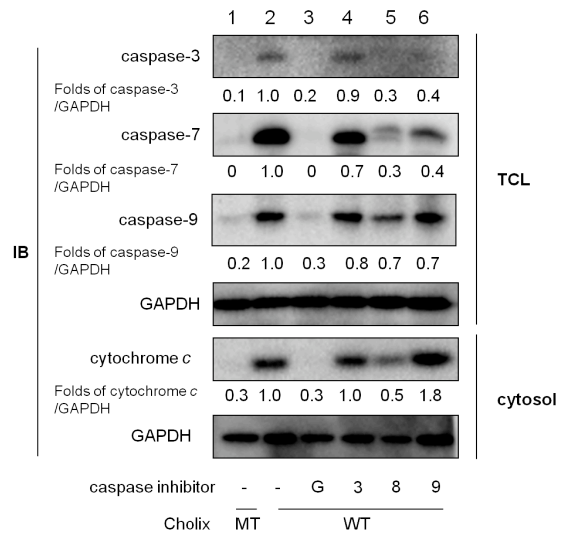


図 3. カスパーゼ阻害剤がアポトーシスシグナルに与える影響 (G: 全カスパーゼ阻害剤)

(7) カスパーゼ 4 によるカスパーゼ 8 の活性化

Cholix が示す細胞致死はカスパーゼ 8 の活性化によって進行すること推察された。しかしカスパーゼ 8 阻害剤は、下流カスパーゼの活性化ならびにチトクローム *c* の放出を阻害するにも拘わらず、細胞致死活性を抑制しなかった。このことから、カスパーゼ 8 の上流に他のカスパーゼが位置することが示唆された。

他のカスパーゼ阻害剤が細胞致死活性に与える影響を網羅的に解析したところ、カスパーゼ 4 の阻害剤が致死活性を一部抑制していた。そこで、カスパーゼ 4 阻害剤がシグナル伝達に与える影響を見たところ、カスパーゼ 4 阻害剤は、8 と同様に下流のカスパーゼの活性化ならびにチトクローム *c* の放出を阻害しただけでなく、カスパーゼ 8 の活性化を抑制していた (図 4)。このことから、Cholix の作用による HeLa 細胞内アポトーシスは、カスパーゼ 4 を起点とすることが示唆された。

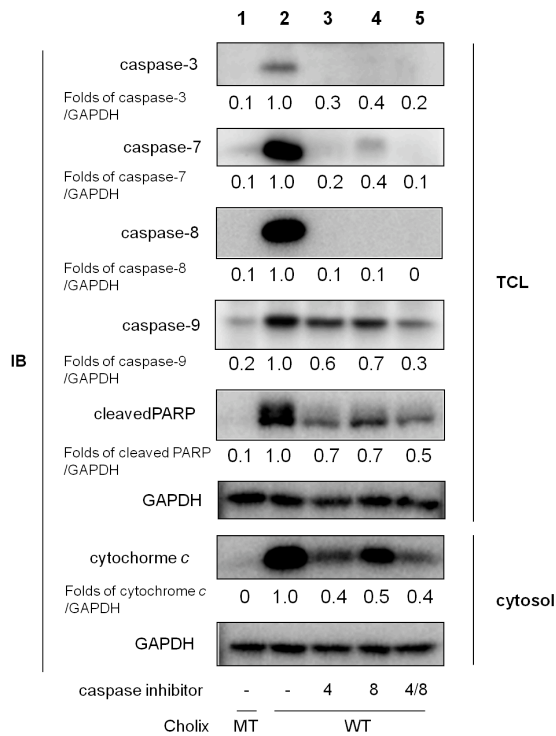


図 4. カスパーゼ 4 阻害剤がアポトーシスシグナルに与える影響

(8) 提唱される経路 (まとめ)

Cholix が HeLa 細胞に示す致死活性機構として、下図に示した経路が提唱される。ADP-リボシル化によるストレスからアポトーシスが進行されるが、その起点にはカスパーゼ 4 が位置し、カスパーゼ 4 が 8 を活性化させる。次に、カスパーゼ 4 と 8 が Bak/Bax の構造変化によるミトコンドリア外膜ポアが形成を介した経路と、ミトコンドリアを介さない経路の両方を進行させることで、下流のカスパーゼを活性化する。これら活性化したカスパーゼによって、最終的に細胞死が引き起こされる。今後、Cholix の ADP-リボシル化活性とアポトーシスとの関係の有無について、さらに詳細に解析を行いたい。

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 1 件)

- Ogura, K., K. Yahiro, H. Tsutsuki, S. Nagasawa, S. Yamasaki, J. Moss, and M. Noda. 2011. Characterization of cholix toxin-induced apoptosis in hela cells. J Biol Chem **286**: 37207-37215. 査読有
DOI:10.1074/jbc.M111.246504

[学会発表] (計 3 件)

- 小倉康平、八尋錦之助、山崎伸二、野田公俊
「Diversity in the mechanism of human cell death caused by ADP-ribosyltransferase Cholix toxin.」第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27 日 長崎ブリックホール (長崎)
- Ogura K, Yahiro K, Yamasaki S, Noda M.
「Apoptotic signaling pathways in HeLa cells induced by Cholix toxin of Vibrio cholerae」 International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011 年 9 月 10 日 札幌コンベンションセンター (北海道)
- 小倉康平、八尋錦之助、山崎伸二、野田公俊
「コレラ菌由来の ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有する Cholix toxin が引き起こすアポトーシスシグナル伝達機構の解析」第 58 回トキシシンポジウム 2011 年 7 月 6 日 順天堂大学 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八尋 錦之助 (YAHIRO KINNOSUKE)
千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授
研究者番号：80345024

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

小倉 康平 (OGURA KOHEI)
千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：00586612