

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590542

研究課題名(和文) ウエルシュ菌 毒素の新規受容体探索：ガングリオシドとの関係

研究課題名(英文) Investigation of Clostridium perfringens alpha-toxin receptor: focus on gangliosides

研究代表者

小田 真隆 (ODA, MASATAKA)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00412403

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)：ガス壊疽の原因毒素であるウエルシュ菌 毒素の受容体探索を行った。その結果、(1) 本毒素のNドメインとCドメインの間に存在するループ領域のTrp-84とTyr-85がガングリオシドGM1aの糖鎖部位と相互作用していることが示唆された。さらに、毒素は、GM1aに結合後、GM1aのクラスター化、およびチロシンキナーゼ関連受容体(TrkA)の活性化を惹起していることが明らかとなった。(2) 毒素は、TrkAのアダプタータンパク質のホスホリパーゼC-1を特異的に活性化していた。(3) 毒素処理細胞膜内で生成亢進したジアシルグリセロールのフリップ-フロップがGM1aとTrkAの集積を導いた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the receptor of Clostridium perfringens alpha-toxin, which is main factor of gas gangrene. First, we revealed that Trp-84 and Tyr-85 in the loop region in the N-domain of alpha-toxin specifically interact with ganglioside GM1a through a carbohydrate moiety, leading to the clustering of GM1a at the cell membrane and activation of tyrosine kinase receptor (TrkA). Second, we discovered that alpha-toxin also specifically activated endogenous phospholipase C-1, a TrkA adaptor protein, via phosphorylation. Third, the flip-flop motion of hydrophobic lipids such as diacylglycerol in the cells treated with the toxin leads to the accumulation of GM1a and TrkA.

研究分野：細菌学

 キーワード：ウエルシュ菌 毒素 ガングリオシド GM1a チロシンキナーゼ TrkA受容体 ホスホリパーゼC-1  
細胞膜流動性

## 1. 研究開始当初の背景

A型ウエルシュ菌は、ヒトの腸管や土壌中に存在するグラム陽性偏性嫌気性芽胞形成桿菌で、食中毒、あるいは壊死性疾患であるガス壊疽の原因菌として知られている。本菌によるガス壊疽の主要な病原因子である $\alpha$ 毒素は、好中球、マクロファージ、および内皮細胞に作用すると活性酸素、サイトカイン、そしてケモカインの遊離を惹起し組織障害を引き起こす。これらの炎症反応にチロシンキナーゼ関連受容体である TrkA 受容体や MAPK カスケードの活性化が関与していることを明らかにしてきたが、 $\alpha$ 毒素の受容体の全容解明には至っていなかった。

## 2. 研究の目的

近年の細菌毒素研究において、細菌毒素の受容体は、タンパク質とガングリオシドとの複合体であるという二成分理論が提唱されている。そこで、糖鎖固定化アレイ、および表面プラズモン共鳴装置を用いて $\alpha$ 毒素とガングリオシドの相互作用について網羅的に解析することにした。さらに、ドッキングシミュレーション解析ソフトを用いて、 $\alpha$ 毒素が有するガングリオシド結合モチーフの探索を試みた。

## 3. 研究の方法

- (1) 24種類のガングリオシド糖鎖がプラスチックプレートに結合した糖鎖固定化アレイ(住友ベークライト社)に蛍光ラベルした $\alpha$ 毒素を添加し、37°C、30分間インキュベーション後、洗浄し蛍光プレートスキャナーで解析した。
- (2) ガングリオシド含有ホスファチジルコリンリポソームを作製し、L1センサーチップに固定化した。その後、各濃度の $\alpha$ 毒素をアナライトとしてアプライし、BIACORE(GE社)で解析した。
- (3)  $\alpha$ 毒素とガングリオシドが相互作用する

領域をドッキングシミュレーション解析ソフト(MOE、菱化システム社)で網羅的に解析した。さらに、ボツリヌス毒素やテタヌス毒素などのガングリオシドと相互作用する毒素のアミノ酸情報および立体構造情報を基に $\alpha$ 毒素のガングリオシド結合領域を推測した。また、ガングリオシド結合領域と推定されるアミノ酸をアラニンに置換した変異毒素を作製し、ガングリオシド含有ホスファチジルコリンリポソームに対する親和性をBIACOREで解析した。

## 4. 研究成果

$\alpha$ 毒素のガングリオシドへの結合特異性について解析するため、糖鎖固定化アレイを用いて解析した結果、GM1aに高い親和性を示すことが判明した(図1)。

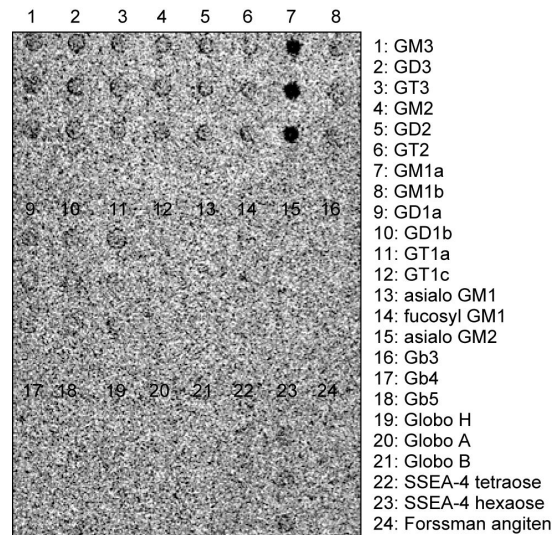


図1 糖鎖固定化アレイを用いた $\alpha$ 毒素とガングリオシドの相互作用解析

そこで、BODIPY-GM1aで染色した肺胞上皮細胞に蛍光ラベル $\alpha$ 毒素を作用させた結果、両者が共局在していること、さらに TrkA も同じ位置に局在していることが判明した。

ボツリヌス神経毒素は、ガングリオシド結合領域(H...SXWY...G)を有することが報告されている。ウエルシュ菌 $\alpha$ 毒素も、GM1aと結合することから、その結合ドメインの有

無を検索すると、 $\alpha$ 毒素分子のNドメイン（触媒ドメイン）とCドメイン（結合ドメイン）を結ぶループ領域にこのドメインの存在が判明した。そこで、この領域のアミノ酸残基を置換した変異毒素を作製し、GM1a ホスファチジルコリンリポソームへの親和性について表面プラズモン共鳴法を用いて解析した。その結果、W84A と Y85A は、GM1a ホスファチジルコリンリポソームへの結合親和性が低下した。また、MOE を用いて  $\alpha$  毒素の W84A と Y85A を含む領域と GM1a の糖鎖部位のドッキングシミュレーションを行った結果、W84 とシアル酸、Y85 とガラクトサミンが水素結合、及び、シアル酸の糖環とのスタッキング相互作用により、安定した結合構造をとることが判明した（図2）。したがって、 $\alpha$  毒素の GM1a への結合に 84 位トリプトファン残基と 85 位チロシン残基が重要な役割を演じていることが判明した。

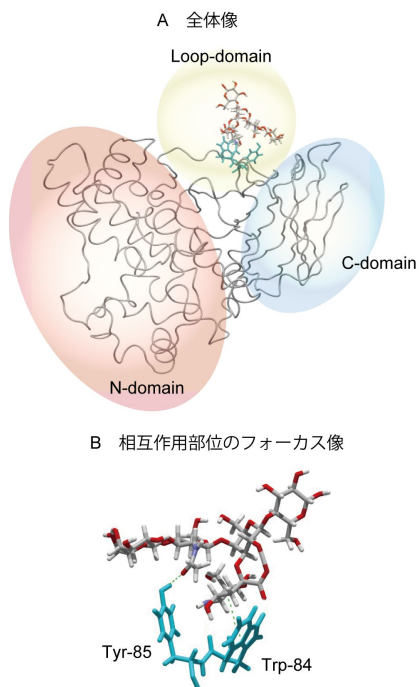


図2  $\alpha$  毒素と GM1a 糖鎖部位とのドッキングシミュレーション解析

また、 $\alpha$  毒素は、GM1a に結合後、毒素自身のホスホリパーゼC活性によりホスファチジルコリンをジアシルグリセロールに分解

することで細胞膜の流動性変化を引き起こし、GM1a に隣接する TrkA を活性化（クラスター化）していることが判明した。さらに、TrkA のアダプタータンパク質である内因性のホスホリパーゼ  $C\gamma$ -1 活性を亢進することで相乗的に膜の動的変化を惹起し、TrkA 下流の MAPK カスケードを活性化していることが判明した。（図3）。

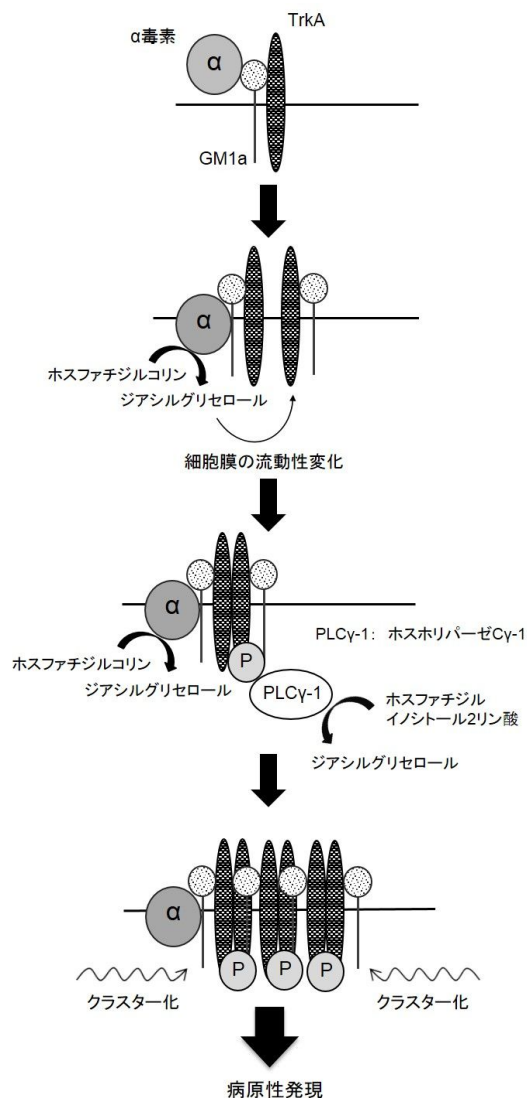


図3  $\alpha$  毒素による細胞膜流動性変化と TrkA 活性化メカニズムの模式図

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

1) Takagishi, T., Oda, M., Kabura, M., Kurosawa, M., Tominaga, K., Urano, S., Ueda, Y., Kobayashi, K., Kobayashi, T., Sakurai, J., Terao, Y., and Nagahama, M. : *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. 査読有り

2) Oda, M., Imagawa, H., Kato, R., Yabiku, K., Yoshikawa, T., Takemoto, T., Takahashi, H., Yamamoto, H., Nishizawa, M., Sakurai, J., Nagahama, M.: Novel inhibitor of bacterial sphingomyelinase, SMY-540, developed based on three-dimensional structure analysis. J. Enz. Inhib. Med. Chem., 29: 303-310, 2014. doi: 10.3109/14756366.2013.777717. 査読有り

3) Nagahama, M., Oda, M., Kobayashi, K., Ochi, S., Takagishi, T., Shibutani, M., Sakurai, J.: 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. 査読有り

4) Oda, M., Fujita, A., Okui, K., Miyamoto, K., Shibutani, M., Takagishi, T., Kobayashi, K., Nagahama, M. *Bacillus cereus* sphingomyelinase recognizes ganglioside GM3., Biochem. Biophys. Res. Commun. 431: 164-168, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.002. 査読有り

5) Oda, M., Kabura, M., Takagishi, T., Suzue, A., Tominaga, K., Urano, S., Nagahama, M., Kobayashi, K., Furukawa, K., Furukawa, K., Sakurai, J.: *Clostridium perfringens* alpha-toxin recognizes the GM1a/TrkA complex. J. Biol. Chem., 287: 33070-33079, 2012. doi:

10.1074/jbc.M112.393801. 査読有り

6) Oda, M., Shiihara, R., Ohmae, Y., Kabura, M., Takagishi, T., Kobayashi, K., Nagahama, M., Inoue, M., Abe, T., Setsu, K., Sakurai, J.: *Clostridium perfringens* alpha-toxin induces the release of IL-8 through a dual pathway via TrkA in A549 cells. Biophys. Biochim. Acta - Molecular Basis of Disease, 1822: 1581-1589, 2012. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.06.007. 査読有り

〔学会発表〕(計 16 件)

- 1) 高岸照久、小田真隆、竹原正也、小林敬子、永浜政博：ウエルシュ菌 $\alpha$ 毒素の脂質クラスター形成に対する内因性PLC- $\gamma$ 1の役割、第88回日本細菌学会総会、長良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）、2015年3月28日
- 2) 高松輝美、高岸照久、小田真隆、小林敬子、竹原正也、永浜政博：ウエルシュ菌 $\epsilon$ 毒素のオリゴマー形成におけるセラミドの役割、第88回日本細菌学会総会、長良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）、2015年3月28日
- 3) 小田真隆：研究のツキと運を呼び込むために、第87回日本細菌学会総会、タワーホール船堀（東京都・江戸川区）、2014年3月26-28日
- 4) 小田真隆、櫻井純、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回トキシシンポジウム、楓香荘（兵庫県・宍粟市）、2013年7月17-19日
- 5) 小田真隆：ウエルシュ菌 $\alpha$ 毒素の病原性発現におけるGM1a/TrkA複合体の役割、第66回日本細菌学会中国・四国支部総会、広島国際大学（広島県・呉市）、2013年10月12-13日、
- 6) 小田真隆、ガス壊疽毒素の受容体探索 < 光を灯した糖脂質糖鎖固定化アレイ >、

第 31 回日本糖質学会、鹿児島市民文化  
ホール（鹿児島県・鹿児島市）、2012 年  
9 月 18 日

- 7) 小田真隆、樽井敬史、亀山直哉、白川大起、  
屋比久賢太、小林敬子、櫻井純、永浜  
政博、Vizantin による自然免疫活性化メ  
カニズム、第 59 回トキシンシンポジウ  
ム、とかちプラザ（北海道・帯広市）、  
2012 年 8 月 30 日

〔図書〕（計 2 件）

1) Nagahama M, Oda M, Tsuge H., Kobayashi  
K.: Enteric toxins of *Clostridium perfringens*:  
Beta Toxin, TpeL, Epsilon Toxin and Iota Toxin.  
Molecular Medical Microbiology-Second edition,  
Vol. 2, ELSEVIER, 997-1013, 2014, ISBN:  
9780123977632

2) Oda M, Nagahama M., Kobayashi K., Sakurai  
J.: Role of tyrosine kinase A receptor (TrkA) on  
pathogenicity of *Clostridium*  
*perfringens* alpha-toxin. Protein Phosphorylation  
in Human Health, InTech, 343-356, 2012, doi:  
10.5772/48515

〔その他〕

ホームページ

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/microbio/microbio.html>

アウトリーチ活動

小田真隆、ガス壊疽毒素の巧みな毒性発現  
メカニズム、宮崎大学医学部-IR 推進機構招  
聘講演、宮崎、2012 年 9 月 10 日

受賞

日本細菌学会中国四国支部、若手研究者奨励  
賞受賞、2013 年 10 月 12 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小田 真隆 (ODA, MASATAKA)

新潟大学・医歯学系・准教授 研究者番号：

00412403