

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870317

研究課題名(和文)嘔吐毒素セレウリドの付加カチオン置換速度の評価とその細胞毒性への影響

研究課題名(英文)Evaluation of cation exchange ratio in emetic toxin cereulide and of effect for cytotoxicity.

研究代表者

岡本 陽 (OKAMOTO, Akira)

愛知教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：60436996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：セレウス菌の産生する嘔吐毒素セレウリドには、カリウムイオン( $K^+$ )とアンモニウムイオン( $NH_4^+$ )が強いアフィニティで配位し、他の1価陽イオンは安定して配位しないことが質量分析の結果から明らかになった。また、ナトリウムイオン( $Na^+$ )が過剰の環境でインキュベートした場合、ナトリウムイオンが配位したセレウリドは確認できなかったものの、HEp-2細胞への毒性が顕著に低下した。以上の結果から、嘔吐毒素セレウリドの毒素活性は産生された場所のカチオン濃度に影響をうけることが示唆された。今後は食中毒との関連から検討をすすめたい。

研究成果の概要(英文)：Mass-spectrometry analysis indicated that the potassium ion ( $K^+$ ) and ammonium ion ( $NH_4^+$ ) was dominantly coordinate the center of emetic toxin cereulide, rather than other cations. Moreover, the cytotoxicity of cereulide for HEp-2 cells was decreased in the environment of excess concentration of sodium ion. These results indicated that the cytotoxic activity of cereulide was affected by the concentration of cations in the environment. The cation exchange property of cereulide and the relation between cation species and cytotoxicity illustrated by this study emphasizes the challenges inherent in solving mechanisms of food-poisoning by *Bacillus cereus*.

研究分野：微生物学

キーワード：セレウス菌 嘔吐毒素 食中毒

## 1. 研究開始当初の背景

セレウス菌 (*Bacillus cereus*) は土壌や穀物をはじめ自然界に広く分布する、芽胞形成性の通性嫌気性グラム陽性菌である。セレウス菌は様々な病原性が知られており、下痢型と嘔吐型に大別される食中毒菌、芽胞の汚染による院内感染、また日和見的な血流感染による重症感染症などが報告されている。感染の多くは日和見感染的なものや、食品への偶発的な汚染が考えられるが、自然界には病原性を示すものからそうでないセレウス菌まで広いバリエーションがある。このようなセレウス菌の株間では染色体の構造に大きな差異はなく、病原因子をコードする大型プラスミドが大きく異なっている。嘔吐毒素であるセレウリドを合成する遺伝子群も、このプラスミドにコードされている。

セレウス菌による嘔吐型食中毒は、低分子化合物である毒素セレウリドによって引き起こされる。セレウリドはオキソ酸を含む D-O-Leu, D-Ala, L-O-Val, L-Val の 4 つのアミノ酸残基を 1 ユニットとし、このペプチドが 3 ユニット環状に連結した 12 員環状ペプチドであり、リボソームではなく特定のたんぱく質によって合成される。環状ペプチドの中心には、カリウムイオン ( $K^+$ ) をはじめとする 1 価カチオンが付加されている。セレウリドは  $K^+$  イオノフォアとしてはたらき、リボソームの膜電位を破綻させることにより細胞に毒力を発揮すると考えられているが、細胞内での詳細な挙動は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、セレウリドは  $K^+$  イオノフォアとしてミトコンドリアに作用することが示唆されている。また、セレウリドには  $K^+$  が付加しているが、質量分析による解析では他のカチオンが付加する可能性もある。そこで我々は、セレウリドに付加したカチオンの置換が可能であるかどうか、 $K^+$  のほかアンモニウムイオン ( $NH_4^+$ )、ナトリウムイオン ( $Na^+$ )、プロトンイオン ( $H^+$ )、およびリチウムイオン ( $Li^+$ ) について検討した。また置換した場合の HEp-2 細胞に対する毒性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) セレウリドに付加するカチオン種の置換

セレウリドに付加するカチオンについて、 $K^+$  以外のものも置換するかどうかを検討した。セレウリド高産生株である *B. cereus* NC7401 株を培養し、溶媒抽出によりセレウリドを精製した。この精製セレウリドを原液 (1 mg/mL, bioassay) とし、各カチオン過剰液で 10 倍に希釈したのち質量分析計を用いて分析した。カチオン置換液としてはそれぞれ、 $NH_4^+$  として 10mM 酢酸アンモニウム溶液、 $K^+$  として 10mM 塩化カリウ

ム溶液、 $Na^+$  として 10mM 塩化ナトリウム溶液、 $Li^+$  として 10mM 塩化リチウム溶液、 $H^+$  として 0.01% リン酸溶液を用いた。

### (2) カチオン交換したセレウリドが細胞に与える毒素活性の経時的変化について

塩化カリウム溶液でインキュベートしたセレウリド溶液をコントロールとして、塩化ナトリウム溶液としたセレウリド溶液の HEp-2 細胞に対する毒素活性を測定した。前述と同様に 10mM 塩化ナトリウム、および 10mM 塩化カリウム溶液とした精製セレウリド液を 1、7、14、28 日間インキュベートしたのち、質量分析および HEp-2 細胞に対する毒素活性を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) セレウリドに付加するカチオン種の置換

セレウリドの付加するカチオン種について、質量分析の結果から  $K^+$  (Fig.1) および  $NH_4^+$  (Fig.2) が付加するものの、 $Na^+$  (Fig.3) や  $H^+$  (Fig.4)、 $Li^+$  (Fig.5) などは安定して検出されなかった。これまでの構造解析においても  $K^+$  と  $NH_4^+$  が観察されているものの、他のカチオン種については報告がない。以上の結果から、セレウリド分子には  $K^+$  が  $NH_4^+$  がよく付加するものの、他のカチオンは少なくとも安定的には付加しない可能性が示唆された。

### (2) カチオン交換したセレウリドが細胞に与える毒素活性の経時的変化について

塩化カリウム溶液、あるいは塩化ナトリウム溶液で 1、7、14、28 日間インキュベートしたセレウリド溶液について HEp-2 細胞に対する毒素活性の評価、ならびに質量分析によるカチオン種の確認を行った。

HEp-2 細胞に対する毒素活性を評価した結果、コントロールに比べ、塩化カリウム溶液では毒素活性が高くなる傾向がみられた。一方で塩化ナトリウム溶液でインキュベートしたセレウリド溶液の HEp-2 細胞に対する毒素活性は顕著に低下した (Table.1)。

しかしながら、上記のとおり  $Na^+$  は安定的にセレウリドに付加しないと考えられる。そこで 1 ヶ月までインキュベートしたナトリウム溶液としたセレウリドを質量分析で確認した結果、やはりカチオン種として  $Na^+$  付加体となっているわけではないことが確認された (Fig.6)。

また、質量分析の結果からセレウリドが分解している様子も確認されなかった。カチオン種が交換していないにもかかわらず、HEp-2 細胞に対する毒素活性が低下した原因についてはさらなる調査が必要である。

セレウリドによる食中毒は世界的に散発例がみられる。加熱調理食品で多く見られるのは、本菌の芽胞形成性に関与していると考え

られている。本菌は穀物などから一般的に分

離されるが、食中毒に関してはチャーハン、スパゲティ、あんこ、粉ミルクなど、偏りがみられる。芽胞形成のみがリスク因子であるとするならば、炊飯（加熱）後に放置する可能性の高い飯などであまり報告されない理由につ

いては説明が難しい。ところで、スパゲティやあんこ、粉ミルクは  $\text{Na}^+$  と比較して  $\text{K}^+$  が優位である（チャーハンに関しては不明）。

セレウリドはカチオンを置換するが、数日程度の時間がかかると仮定すると、培養細胞へのセレウリドの毒力は、セレウス菌が増殖し、セレウリドを産生するその場に存在するイオンの比率の影響を大きく受ける可能性が推測される。

つまり、 $\text{K}^+$  が多いという特徴を持つ穀物由来の食品は、セレウス菌による嘔吐型食中毒に対するリスクが高いという仮説が立てられる。今後の課題として、実際の食品中でセレウス菌を培養した際に産生されるセレウリドの毒力に加え、質量分析によるカチオン種の解析も行いたい。

また、本研究の過程で、従来は評価が難しかったミトコンドリアの空胞化について、細胞を染色することで容易に確認できることを見出した（現在論文投稿中）。セレウリドには構成アミノ酸が異なる亜種が存在することが他の研究グループにより報告されていることから、細胞毒性を評価する重要性が高まっている中で重要な意味をもつ報告であると考えられる。

Table 1. Cereulide toxicity for HEP-2 cells. The toxicity of cereulide was evaluated with vacuolation of mitochondria in HEP-2 cells. “Days” indicated incubation period (days) in cation exchange solution. “Titer” indicated the toxic activity of cereulide with HEP-2 cell bioassay.

	days	Titer (ng/ml)
	control	1,280
$\text{K}^+$	1	640
	7	1,280
	14	1,310,720
	28	163,840
$\text{Na}^+$	1	20
	7	7
	14	5
	28	5

Fig.1

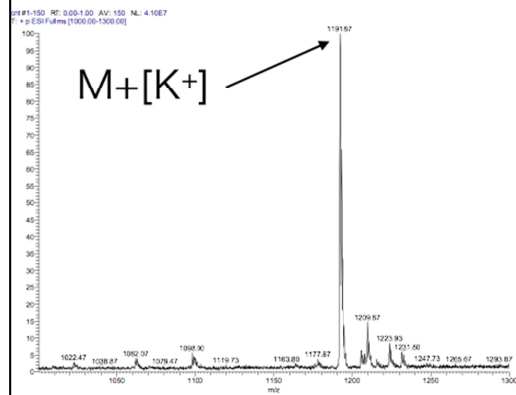


Fig. 1. Mass spectrometer of cereulide that incubated with 10mM KCl as a potassium ion ( $\text{K}^+$ ) exchange solution.

Fig.2

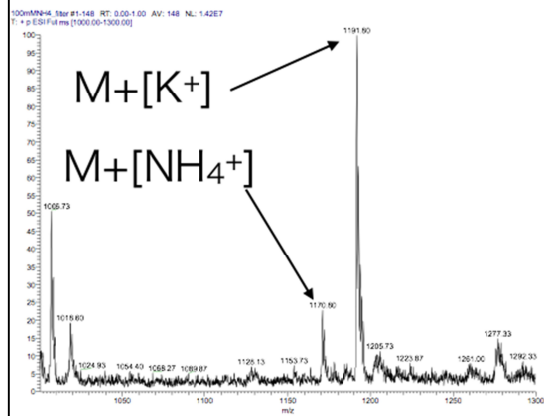


Fig. 2. Mass spectrometer of cereulide that incubated with 10mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as a ammonium ion ( $\text{NH}_4^+$ ) exchange solution.

Fig.3

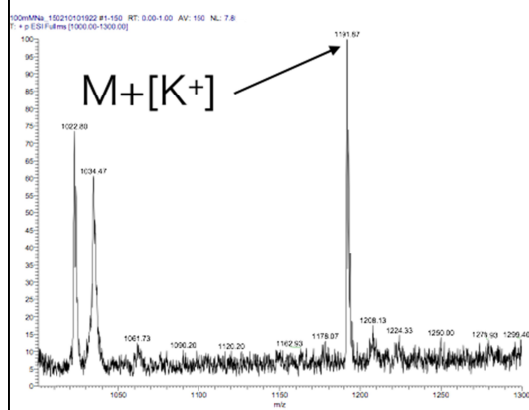


Fig. 3. Mass spectrometer of cereulide that incubated with 10mM NaCl as a sodium ion ( $\text{Na}^+$ ) exchange solution.

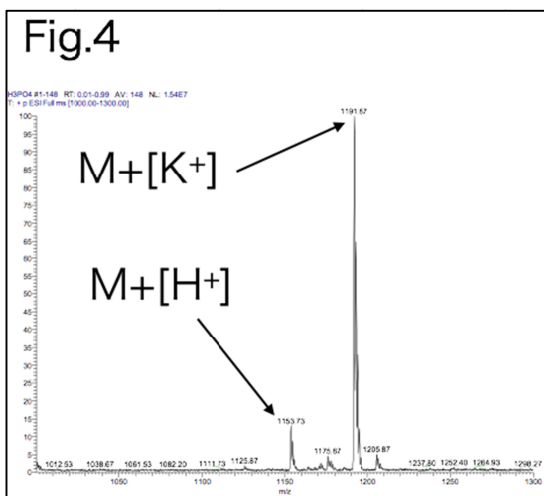


Fig. 4. Mass spectrometer of cereulide that incubated with 0.01%  $H_3PO_4$  as a proton ion ( $H^+$ ) exchange solution.

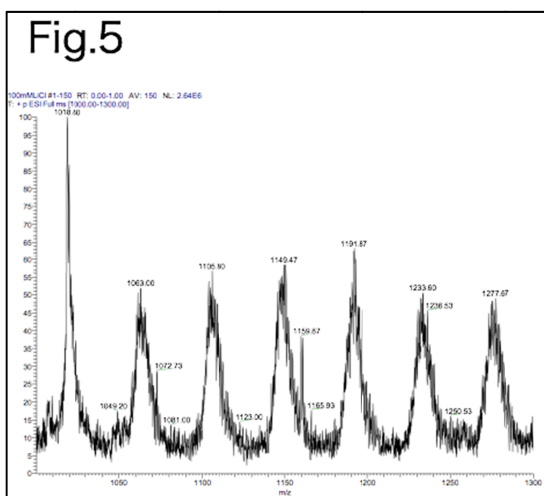


Fig. 5. Mass spectrometer of cereulide that incubated with 10mM LiCl as a lithium ion ( $Li^+$ ) exchange solution.

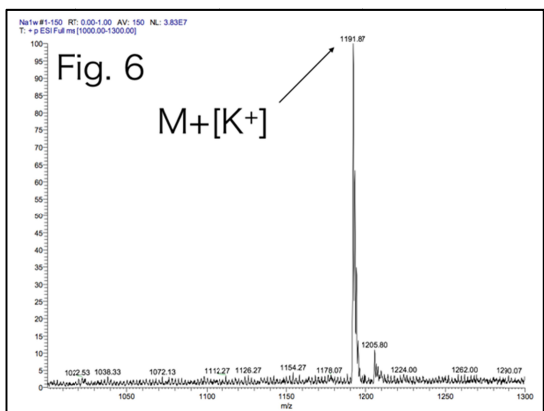


Fig. 6. Mass spectrometer of cereulide that incubated with 10mM NaCl as a sodium ion ( $Na^+$ ) exchange solution for 1 month. Although the toxicity of incubated cereulide

solution was attenuated, only potassium ion( $K^+$ ) was observed as an added cation in cereulide.

## 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)

Satoru Hasegawa, Sae Goto, Hirokazu Tsuji, Tatsuya Okuno, Takashi Asahara, Koji Nomoto, Akihide Shibata, Yoshiro Fujisawa, Tomomi Minato, Akira Okamoto, Kinji Ohno, Masaaki Hirayama

“Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson’s Disease”, PLoS ONE, vol.10 (11),2015,e0142164. 査読あり, DOI:10.1371/journal.pone.0142164

〔学会発表〕(計1件)

岡本陽, “セレウス菌の嘔吐毒素セレウリドの毒力はカチオン比に影響を受ける”, 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)

〔図書〕(計1件)

Y-H. Taguchi, Mitsuo Iwadate, Hideaki Umeyama, Yoshiki Murakami, Akira Okamoto “Big Data Analytics in Bioinformatics and Healthcare” IGI Global, 2014, Chapter 7, 138-162

DOI: 10.4018/978-1-4666-6611-5

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 陽 (OKAMOTO, Akira)

愛知教育大学教育学部養護教育講座・准教授  
研究者番号: 60436996

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし