

博士論文

ウエルシュ菌 α 毒素の受容体探索と作用機
構の解析

徳島文理大学大学院薬学研究科
薬学専攻 博士課程

高岸 照久

指導教授 永浜政博

平成二十八年提出

ウエルシュ菌 α 毒素の受容体探索と 作用機構の解析

目次

略語一覧	3
緒論	5
第一章 α 毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離と TrkA 活性化の関係	17
第一節 α 毒素投与マウスにおける GRO/KC の遊離	19
第二節 α 毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離と TrkA の関係	28
第三節 α 毒素による IL-8 の遊離機構	41
第四節 考察および小括	51
第二章 α 毒素受容体の同定	65
第一節 α 毒素の作用とガングリオシドの関係	66
第二節 ガングリオシド欠損マウスを用いた α 毒素の作用解析	71
第三節 α 毒素分子中の GM1a との結合領域	74
第四節 考察および小括	86
第三章 α 毒素受容体のクラスター形成機構の解析	99
第一節 α 毒素による TrkA/GM1a クラスター形成	100

第二節 α 毒素受容体のクラスター形成と内因性 PLC との関係	103
第三節 α 毒素による膜ダイナミクスの変化.....	112
第四節 考察および小括.....	115
第四章 総括および結論	126
引用文献.....	134
発表論文	143
謝辞.....	144

略語一覽

BoNT: Botulinum neurotoxin

ChoP: Choline phosphate

CXCR1: Chemokine (C-X-C motif) receptor 1

DAG: Diacylglycerol

ERK1/2: Extracellular regulated kinase 1/2

EYFP-C1AB: Enhanced yellow fluorescent protein-tagged C1AB domain of protein kinase C- γ

GRO: Growth-related oncogene

GM1a: Monosialotetrahexosyl ganglioside (GM1a)

IL-8: Interleukin-8

KC: Keratinocyte-derived cytokine

MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase

MEK: Mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase kinase

NF- κ B: Nuclear factor kappa B

PC: Phosphatidylcholine

PDK1: Phosphoinositide-dependent kinase-1

PI: Phosphatidylinositol

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKC θ : Protein kinase C θ

PLC: Phospholipase C

PPMP: *D*-threo-1-phenyl-2-hexadecanoylamino-3-morpholino-1-propanol

PS: Phosphatidylserine

S1P: Sphingosine-1-phosphate

SAPK/JNK: Stress-activated protein kinase / Jun amino-terminal kinase

SM: Sphingomyelin

SMase: Sphingomyelinase

SPR: Surface plasmon resonance

TeNT: Tetanus neurotoxin

TrkA: Tyrosine kinase A (Tropomyosine-receptor kinase A)

アミノ酸の略号

A	:Ala	アラニン	N	:Asn	アスパラギン
D	:Asp	アスパラギン酸	S	:Ser	セリン
G	:Gly	グリシン	W	:Trp	トリプトファン
H	:His	ヒスチジン	Y	:Tyr	チロシン

諸 論

ウエルシュ菌は、1880年代に発見され、現在では、*Clostridium perfringens* という名称で分類されているが、以前は発見者である William H. Welch の名に因んで、*Clostridium welchii* と呼ばれていた。従って、我が国では本菌に対して、慣用的にウエルシュ菌という言葉が用いられている。ウエルシュ菌は、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*) などと同様にクロストリジウム属に属するグラム陽性の偏性嫌気性桿菌である。他のクロストリジウム属の偏性嫌気性菌と比較すると比較的嫌気度の低い環境下でも増殖可能であり、また、本菌は、クロストリジウム属としては珍しく鞭毛を持たない非運動性の細菌であり、栄養状態が悪化すると、栄養型細胞の中央、または、一端に楕円形の芽胞を形成する。そのため、加熱調理に対する抵抗性が高く、大規模な食中毒を引き起こすことがある。ウエルシュ菌は、現在、12種のタンパク毒素を産生し、そのうち主要な4つの毒素、 α 、 β 、 ϵ 、そして、 ι 毒素の産生能の違いによりA~E型菌の5種類に分類される (Table 1) (1-3)。いずれの菌型においても、 α 毒素を産生するが、 α 毒素のみを産生する菌型をA型ウエルシュ菌という。A型ウエルシュ菌は、ヒトや動物の腸内常在菌であり、さらに、下水、河川、海、耕地などの土壌に広く分布している。一方、本菌は、第一次世界大戦では細菌兵器として使用された経緯があり、病原性が極めて強い細菌である(1, 4)。

A型ウエルシュ菌は、ガス壊疽(1, 4)や食中毒(5-7)などの原因菌 (Table 2) である。ウエルシュ菌によって引き起こされるガス壊疽は、主に、創傷部からの外傷性感染と、腸管や胆道系からの非外傷性感染により発症する。ガス壊疽の場合、感染成立の条件として、創傷局所の壊死、血行不良、共生する種々の菌による感染局所の嫌気度の上昇などが要求される。すなわち、本菌の増殖が亢進される条件が満たされない限り、感染が成立することはないと考えられている。ウエルシュ菌によるガス壊疽の発症は、本菌が組織に侵入し、嫌气的条件下で局所において菌の増殖が開始されると、周辺の組織が破壊され、破壊産物を栄養源として増殖が亢進する。本菌の増殖に伴って、

菌の増殖による代謝産物としてガスの貯留が引き起こされ、組織を圧迫し、また、凝固系の過剰な活性化により血行不良が引き起こされ、感染局所の嫌気度が亢進する。その結果、菌の増殖が容易になり、非常に速く周囲の正常組織が破壊され、壊死巣の拡大が急速に進行する(1, 4)。一般的なガス壊疽の臨床症状は、軽症の場合、創傷部を中心とした疼痛、腫脹、浮腫、皮膚の発赤、水疱形成、さらに、皮下へのガスの貯留が認められ、重症になると、筋組織の壊死、感染部からの悪臭を伴う滲出液の流出、筋組織内へのガスの貯留、発熱、頻脈、黄疸、そして、衰弱などの全身的中毒を併発する。さらに、症状が悪化すると、ショック状態を引き起こし、死に至る疾患である(1, 4)。ガス壊疽の起病因子は、本菌によるガス壊疽実験モデル動物において、抗 α 毒素抗体により発症が抑制されること、また、 α 毒素の酵素活性が不活化された変異毒素の場合、マウス筋組織の壊死など、ガス壊疽様の組織破壊が認められないことから、本菌が産生する α 毒素がガス壊疽の起病因子であると考えられている(1, 4)。さらに、ガス壊疽において、 α 毒素は、上皮細胞、血小板、そして、好中球などの細胞内への情報伝達系を攪乱し、その結果、様々な細胞間メディエーターや接着分子の産生が制御できなくなることが知られている(8)。

α 毒素は、Yamakawa と Ohsaka (9)、Krug と Kent (10)、Takahashi (11)、さらに、Fujii ら (12)によってウエルシュ菌の培養上清からの精製法が報告された。本毒素の性状は、分子量約 43,000、等電点(pI) 5.4、熱に安定、トリプシンに感受性のタンパク質である(Table 3)。ただし、 α 毒素は 60°C付近までの温度の上昇に伴い活性が低下するが、さらに温度が上がると、アレニウス効果を示して活性が上昇する、耐熱性タンパク質の特徴を示す(1, 4)。 α 毒素は、種々のリン脂質を加水分解する酵素活性を有している(Fig. 1)。本毒素は、ホスファチジルコリン(PC)の3位のリン酸エステルを切断し、ホスホリルコリン(ChoP)とジアシルグリセロール(DAG)に加水分解するホスホリパーゼC(PLC)活性(1, 4)、スフィンゴミエリン(SM)の3位のリン酸エステルを切断し、ChoPとセラミド(Cer)に加水分解するスフィンゴミエリナーゼ(SMase)活性(1, 4)、そして、合成基質であるp-ニトロフェニルホスホリルコリンをChoPとp-ニトロフェノールに分解するホ

スホジエステラーゼ活性(1, 4)を有する。これらの酵素活性には、すべて Zn^{2+} が関与し、本毒素は、 Zn^{2+} 依存性酵素である (Fig. 2)。本毒素の PC 加水分解活性は、SM に対する場合の約 100 倍強い活性を示すこと、さらに、Nagahama らは、本毒素の PC 分解活性は、PC の脂肪酸側鎖が飽和脂肪酸のみで構成されている PC には全く認められないが、炭素鎖が短い、あるいは、不飽和脂肪酸側鎖を有する PC に対しては高い感受性を示すことを報告した(13, 14)。また、本毒素によるリポソーム破壊作用は、リン脂質の構成脂肪酸側鎖の炭素数と不飽和度に影響され、相転移温度が低いリン脂質からなる PC リポソームほど、 α 毒素は高い膜破壊作用を示した(14, 15)。

α 毒素をコードする遺伝子は、Titball ら、及び、Okabe らによって単離され、370 個のアミノ酸からなり、N 末端アミノ酸がトリプトファン (Trp) 残基、そして、C 末端アミノ酸がリジン (Lys) 残基であると報告されている (Table 3)。 α 毒素の全塩基配列から推定されるアミノ酸配列(16)において、N 末端の Trp から 247 番目のアスパラギン酸 (Asp) までの領域は、セレウス菌 (*Bacillus cereus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、そして、ビフェルメンタンス菌 (*Clostridium bifermentans*) の産生するホスホリパーゼ C (PLC) 遺伝子から推察されるアミノ酸配列と、非常に高い相同性が認められた。さらに、 α 毒素の N 末端から 247 番目までの領域に α 毒素が保有する PLC 活性などの触媒領域が存在し、また、これらの酵素は、この触媒領域にいずれも Zn^{2+} 、または、2 価イオンを有していると報告された(17, 18)。さらに、Hough ら(17)は、 α 毒素の N 末端領域のアミノ酸配列と相同性の高いセレウス菌 PLC (BCPLC) の X 線解析によって得られた 3 次元構造から、 α 毒素も Zn^{2+} 結合モチーフにより 3 個の Zn^{2+} が保持されていることを推察した。Nagahama ら(19-21)は、 α 毒素において、 Zn^{2+} 結合モチーフ中のヒスチジン (His) 残基 (11, 68, 126, 136, 148 位)、Asp 残基 (56, 130 位)、グルタミン酸 (Glu) 残基 (152 位) に注目し、これらのアミノ酸残基を部位特異変異法で他のアミノ酸残基に置換した変異毒素の解析から、Fig. 2 に示すように、11 位の His は 1 位の Zn^{2+} と、130 位の Asp は 1, 3 位の金属イオンと配位して、毒素の構造維持に関与すること、148 位の His と 152 位の Glu は 2 位の Zn^{2+} と配位結合

し、酵素活性である触媒作用に重要であること、さらに、68、126、136 位の His は細胞への結合に重要な3位の2価金属イオンと配位結合して働いていることを報告した(19, 20)。その後、Naylor によって α 毒素の三次元構造が解析され、本毒素は、N 末側の250 残基のドメイン(Nドメイン)とC 末側の251-370 残基のドメイン(Cドメイン)からなることが判明した(Fig. 3)(22)。N ドメインは、 α ヘリックス構造を示し、その中に存在するクレフトには、細菌が産生する PLC の酵素活性に共通のアミノ酸残基が存在していた。さらに、BC-PLC の X 線解析によって得られた触媒ドメインの三次元構造と α 毒素の N ドメインは著しく類似していることから、この N ドメインは、毒素の触媒作用に関与することが明らかとなった。一方、C 末端領域は、 β バレル構造を示す C2 ドメインファミリーのタンパク質と共通の構造を有し、C2 ドメインは、細胞の結合に関与することから、本毒素の C ドメインは、毒素の標的細胞への結合に関与していると推察される。Nagahama ら(15)は、 α 毒素の NドメインとCドメインの役割を明らかにするため、NドメインとCドメインの組換え体を作製した。その結果より、Nドメインは、PLC 活性を有し、C ドメインは膜結合活性を示し、それぞれ単独では、ウサギ赤血球の溶血作用は示さなかった。一方、Cドメインは、Nドメイン及び BC-PLC 共存下で溶血活性を示すこと、さらに、BC-PLCとCドメインのフュージョンタンパク質も溶血活性を示すと報告した。また、Cドメインの膜への侵入を明らかにするため、263 位と365 位セリン(Ser)残基をシステイン(Cys)残基に置換後、SH 基に結合するアクリロタンでラベルした Cドメインを作製した。アクリロタンの蛍光は、疎水性環境ではブルーシフトすることが知られている。そこで、アクリロタンでラベルしたCドメインをリポソームとインキュベーションすると、アクリロタンの蛍光がブルーシフトし、C ドメインが脂質二重層の疎水領域に進入することが明らかとなった。さらに、C ドメインは、N ドメインと基質との親和性を増加させ、CドメインがNドメインの酵素活性や溶血活性発現時において、脂質膜への結合に関与していると報告した(15)。従って、 α 毒素の膜破壊作用は、Nドメインの触媒作用と膜への結合に関与するCドメインのコラボレーションが必須であることが明らかにされた。

Shimizu らは、A 型ウエルシュ菌 Strain13 株の全ゲノムの解析に成功した(23)。その

ゲノムは、約 3.0 Mb の染色体と 54 Kb のプラスミドから成り、その DNA の GC 含量は、28.5%と低く、染色体には、2660 個の ORF が存在することが明らかにされた。さらに、毒素タンパクなどを含む病原遺伝子発現調節機構は、VirR-VirS 系の二成分制御系が関与することを解明した。すなわち、ウエルシュ菌の菌体表面に存在するセンサータンパクである VirS が外界からの刺激を受けると、細胞内の VirR タンパクに情報が伝わり、 α 毒素、コラゲナーゼ、パーフリンゴリシン O やタンパク分解酵素などの mRNA の転写が促進され、タンパク産生が刺激されることを報告した(23)。すなわち、 α 毒素の産生は、外界からのシグナルにより毒素の産生量が影響を受けると考えられる。同時に本菌には、VirR-VirS 系以外にも、多くの二成分制御系が存在していることも明らかとなり、ウエルシュ菌は、これらのシグナルによって複雑に毒素産生がコントロールされていると考えられる。

α 毒素の生体に対する作用は、種々の動物、組織、細胞で報告されている。Ohsaka ら(24)は、 α 毒素をラットの腸間膜に滴下すると、初期には細動脈の変化は認められないが、時間の経過とともに、細動脈の血管に好中球を含む白血球の付着、そして、血小板凝集塊が形成され、その結果、毛細管の血流停止を生じ、細動脈が凝集塊で閉鎖され、その血管領域全体の血流が停止すると報告した。また Bryant ら(25)は、 α 毒素をヒトの血液に処理すると、血小板凝集塊の形成後、その血小板の表面に細胞接着分子である P-セレクチンが発現し、好中球と複合体を形成すること、そして、好中球は、複合体の形成により血管からの組織移行に障害が生じることを報告した。さらに、Fujii ら(12)は、 α 毒素を血管組織に作用させると、毒素が血管内皮細胞において内因性 PLC の活性化を介するホスファチジルイノシトール 4,5 - 2リン酸 (PIP₂)の分解を引き起こし、同時に DAG 生成が亢進し、その後、生成した DAG にホスホリパーゼ A₂ が作用してアラキドン酸を遊離し、この結果、アラキドン酸カスケードが活性化されトロンボキサン A₂の生成が促進し、血管平滑筋の収縮が惹起されるという一連の機構を明らかにした。すなわち、 α 毒素による血圧上昇は、血管平滑筋の収縮に起因し、血管収縮作用が血流障害を惹起すると報告した(26)。

α 毒素による溶血は、ヤギ等の一部の動物を除くほとんどの動物赤血球で認められ(1, 4)、Sakurai ら(27-29)は、 α 毒素によるウサギ赤血球の溶血機構について検討し、本毒素が血球膜に結合後、百日咳毒素 (PT)感受性 G タンパク質 (Gi)を介して内因性 PI-PLC の活性化を誘導し、PIP₂を DAG とイノシトール 3リン酸に分解すること、さらに、生成亢進した DAG により内因性ホスホリパーゼ D 活性が上昇し、ウサギ赤血球膜中に多く含まれる PC がホスファチジン酸へと代謝され、ホスファチジン酸が大量に産生された結果、膜が不安定となり溶血が引き起こされると報告した(27-29)。

Ochi ら(30)、そして、Oda ら(31)は、血球膜に PC をほとんど含まず、SM を多量に含有するヒツジ赤血球の α 毒素による溶血メカニズムについて解析した。その結果、本毒素は、ヒツジ赤血球膜のラフトに結合後、Gi タンパク質を介して内因性 SMase を活性化させ、セラミド、スフィンゴシン、そして、スフィンゴシン 1-リン酸(S1P)の一連の SM 代謝系の亢進を惹起すること、さらに、細胞内 S1P 濃度の上昇と同時に細胞外より Ca²⁺を流入させることにより赤血球膜の恒常性の破綻を誘導することを明らかにした。特に、本毒素によるヒツジ赤血球溶血に C24:1 の脂肪酸側鎖を含む SM 代謝が密接に関与していることを LC/MSMS を用いたメタボロミクス解析により明らかにした (Fig. 4)。

α 毒素は、赤血球に対する溶血作用の他に、白血球(32)、内皮細胞(21, 25)、肥満細胞(33)に対しても、破壊、及び、障害等の細胞毒性作用を示すことが報告されている。所属する研究室では、本毒素の好中球に対する作用を検討し、 α 毒素は Gi タンパク質を介した内因性 PLC の活性化を誘導し DAG 産生を亢進すること、さらに、好中球膜に存在するチロシンキナーゼ受容体、特に、Tropomyosin-receptor kinase A (TrkA)受容体をリン酸化することで、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K)、及び、ホスホイノシチド依存性キナーゼ (PDK1)を活性化することを明らかにした(34)。さらに、DAG 産生と PDK1 の活性化によりプロテインキナーゼ C θ (PKC θ)が強く活性化され、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK)経路を介した活性酸素産生を惹起することも明らかにした(34)。一方、Oda ら(35)は、ラット副腎髄質褐色細胞腫由

来 PC12 に α 毒素を作用させると、TrkA を介して神経突起伸長作用を示すことを報告している。さらに、 α 毒素は TrkA を介して TNF α の遊離に伴うサイトカインストームを惹起して致死作用を示すこと、そして、これらの作用を 14 員環マクロライド系抗生物質であるエリスロマイシンが抑制することを明らかにしている(36)。以上から、本毒素は TrkA に結合して作用する可能性が考えられる。本毒素の細胞に対する作用として、 α 毒素は、MEK/ERK シグナル伝達経路を活性化し、活性酸素種 (ROS) の産生を亢進させ、筋肉組織の破壊を惹起することが報告されている(37)。さらに、チャイニーズハムスター線維芽細胞由来 DonQ 細胞に α 毒素を作用させると、本毒素は細胞に侵入し、初期エンドソームから後期エンドソーム、そして、リソソームに輸送されることを明らかにし、本毒素は細胞膜表面で作用を示す場合と細胞内で作用する可能性が報告された(38)。

α 毒素をマウスに尾静脈内投与すると、肝臓や腎臓などを中心とする臓器において血管内での好中球集積、及び、サイトカインストームが認められる。全身性の炎症は、通常、好中球、及び、単球が密接に関与し、その遊走に炎症性ケモカインが重要な役割を担っていることが知られている(39, 40)。Bryant と Stevens は、 α 毒素を細胞に作用させると、好中球遊走に関与する炎症性ケモカインであるインターロイキン-8 (IL-8) の遊離が認められると報告している(41)。また、本菌の感染によりガス壊疽を呈した筋組織を病理学的に観察すると、筋組織の破壊、及び、その周辺部に好中球の浸潤が認められることから、本菌による病巣拡大に好中球の活性化による組織障害が関与すると推察される。しかしながら、本毒素による詳細な好中球活性化メカニズムは不明である。今回、 α 毒素による好中球の活性化と IL-8 との関係を明らかにするため、まず、本毒素による IL-8 遊離メカニズムを解析した。次に、本毒素による生物活性発現機構を理解する糸口を得るために、 α 毒素が結合する受容体の同定を試行した。さらに、本毒素が受容体結合後、IL-8 遊離までの生物活性発現に至るシグナル伝達経路について検討したので詳述する。

Table 1 Distribution of the major toxins among *Clostridium perfringens*.

Type	Major toxins			
	Alpha	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+*	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+*	-
E	+	-	-	+

+ : produced

- : Not produced

* : Prototoxin; Activated by proteolytic enzymes such as trypsin

Sakurai, J., *Rev. Med. Microbiol.*, 6, 175-185 (1995)

Sakurai, J. et al., *J. Toxicol.-Toxin Reviews*, 16, 195-214 (1997)

Table 2 Diseases produced by toxigenic types of *Clostridium perfringens*.

Type	Major toxins	Diseases
A	α	Myonecrosis, Food poisoning, Necrotic enteritis in fowl, Enterotoxemia in cattle and lambs, Necrotizing enterocolitis in piglets ; possibly equine colitis, Canine hemorrhagic gastroenteritis
B	α, β, ϵ	Dysentery in newborn lambs, Chronic enteritis in older lambs (pine), Hemorrhagic enteritis in neonatal calves and foals, Hemorrhagic enterotoxemia in adult sheep
C	α, β	Enteritis necroticans (pigbel) in humans ; Necrotic enteritis in fowl ; Hemorrhagic or necrotic enterotoxemia in neonatal pigs, lambs, calves goats, foals ; Acute enterotoxemia (struck) in adult sheep
D	α, ϵ	Enterotoxemia in lambs (pulpy kidney) and calves, Enterocolitis in neonatal and adult goats, possibly enterotoxemia in adult cattle
E	α, ι	Enterotoxemia likely in calves and lambs, Enteritis in rabbits ; Host range and disease type unclear

Table 3 Properties of *Clostridium perfringens* alpha-toxin.

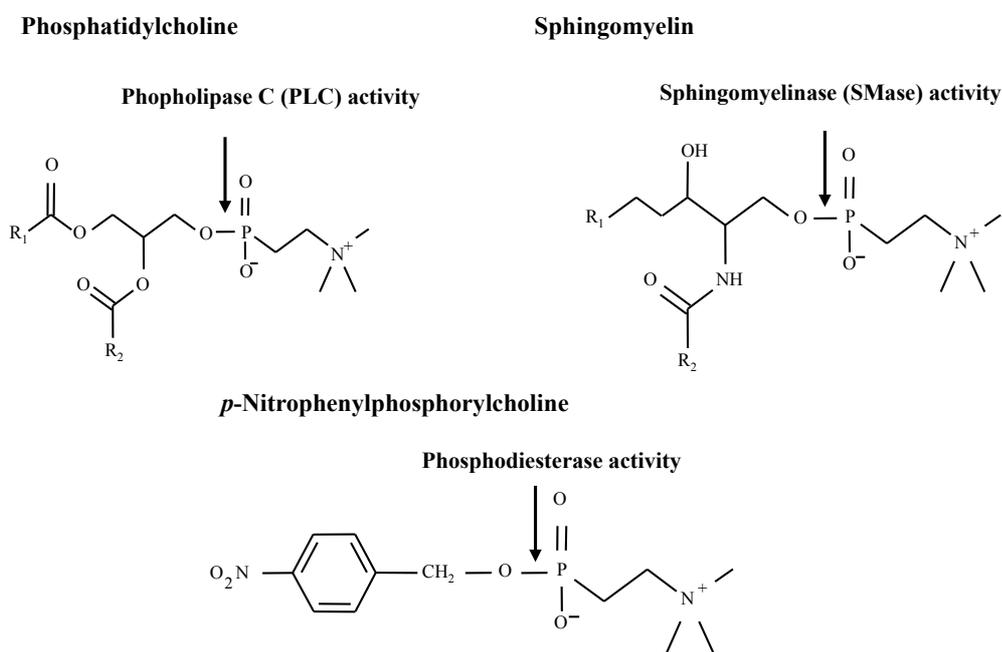
Molecular weight	42,521
Isoelectric point	5.3 ~ 5.6
N-terminal amino acid	Tryptophan
C-terminal amino acid	Lysine
Biological activity	Lethality, Demonecrosis, Hemolysis^{a)}, Platelet aggregation, Elevation in blood pressure, Contraction of isolated rat aorta, Contraction of isolated rat ileum, Potentiation on contraction of isolated rat vas deferents elicited by norepinephrine
Enzymatic activity	Phospholipase C (PLC)^{b)} Sphingomyelinase (SMase)

a) Erythrocyte susceptibility; cattle, mice, rabbits, sheep, humans, chickens, rats

b) Substrate specificity; phosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylserine, Phosphatidylethanolamine, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylethanolamine

Sakurai, J., *Rev. Med. Microbiol.*, 6, 175-185 (1995)

Fig. 1 Cleavage site of major substrates by alpha-toxin.

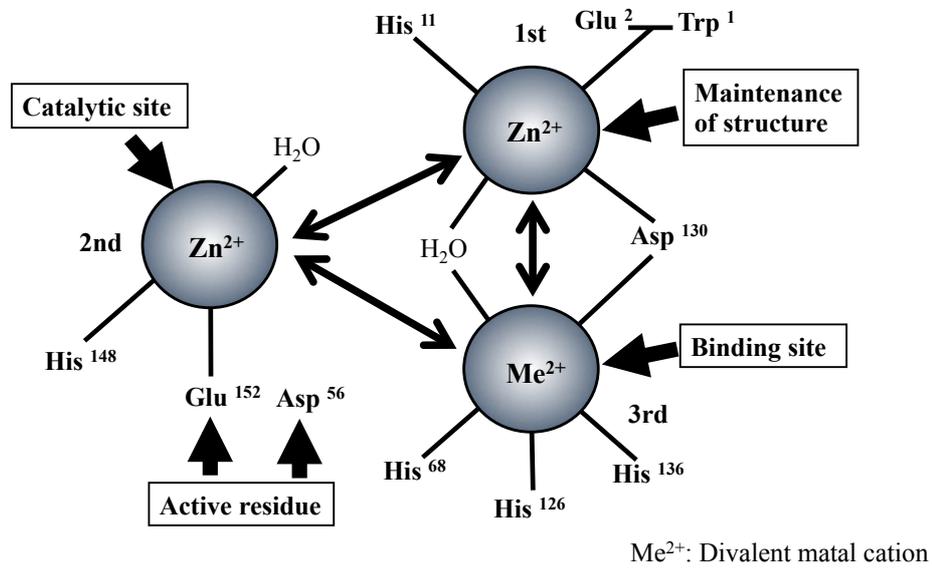


MacFarlane, M. G. and Knight, B. C., *Biochem. J.*, 35, 884-902 (1941)

Stahl, W. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 154, 47-55 (1973)

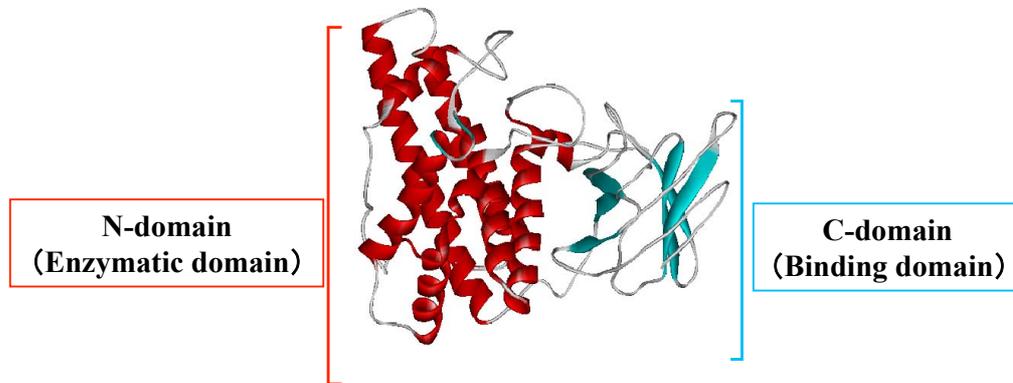
Kurioka, S. and Matsuda, M., *Anal. Biochem.*, 75, 281-289 (1976)

Fig. 2 The relationship between amino acid residues and divalent metal ions in alpha-toxin.



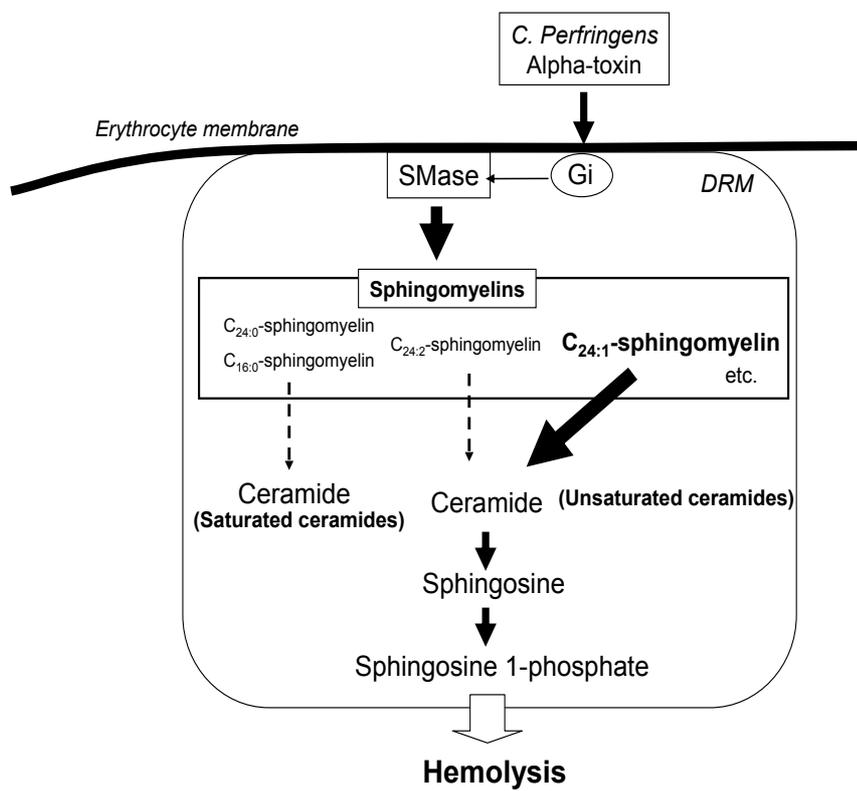
Nagahama, M. et al., *J. Bacteriol.*, **177**, 1179-1185 (1995)
 Sakurai, J., *Rev. Med. Microbiol.*, **6**, 175-185 (1995)
 Nagahama, M. et al., *Infect. Immun.*, **65**, 3489-3492 (1997)

Fig. 3 Structure of alpha-toxin.



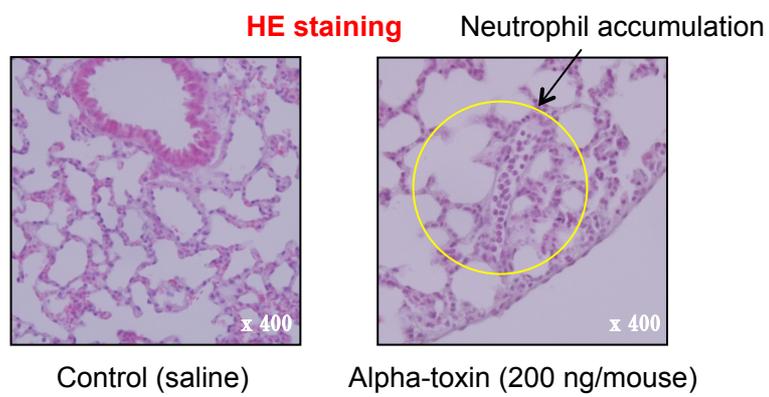
Naylor, C. E., et al., *Nat. Struct. Biol.* **8**, 738-746 (1998)

Fig. 4 Mechanism of hemolysis induced by alpha-toxin in sheep erythrocytes.



Oda, M. et al., *J. Lipid Res.*, **49**, 1039-1047 (2008)

Fig. 5. Neutrophil accumulation into the lung in mouse treated with alpha-toxin.



本 論

第一章 α 毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離と TrkA 活性化の 関係

A 型ウエルシュ菌感染症の特徴は、感染組織内、特に、血管内での好中球集積と接着による異常な凝集体を形成することである。すなわち、本菌感染による好中球の異常な活性化(走化性及び接着活性の増加)が血管内から感染部位への好中球浸潤の阻害をもたらし、宿主の生体防御を回避し、本菌の増殖を向上させる。ウエルシュ菌が産生する α 毒素は、好中球の異常な活性化を誘導する主要な病原因子として考えられている。

所属する研究室では、 α 毒素をウサギ好中球に処理すると、細胞膜の受容体に作用し、三量体 GTP 結合タンパク質(Gi)を介した内因性 PLC の活性化を誘導し DAG 産生を亢進すること、さらに、好中球膜に存在するチロシンキナーゼ受容体、特に、Tropomyosin-receptor kinase A (TrkA)の活性化を誘導し、この両経路を介して活性酸素産生を惹起することを報告した(34)。

α 毒素の生体内での作用を確認すると、肺、肝臓、そして、腎臓の血管内での好中球の集積や接着を誘導した(Fig. 5)。好中球の活性化因子、特に、遊走因子(走化性因子)としては、ロイコトリエン-B₄、補体成分 C5a や C3b、さらに、ケモカインなどが知られている。その中でも、炎症性ケモカインである interleukin-8 (IL-8)は、特に、好中球の遊走と接着に重要な因子として考えられている。Bryant と Stevens は、 α 毒素を内皮細胞に作用させると、IL-8 が遊離すると報告した(41)。そして、 α 毒素とアミノ酸配列の相同性が高い、緑膿菌が産生する溶血性 PLC は、単球及び内皮細胞から IL-8 の遊離を惹起させ、肺への好中球の集積を誘導すると報告された(42)。

そこで、 α 毒素による好中球活性化機構を解明するために、IL-8 に着目して解析を行った。

第一節 α 毒素投与マウスにおける GRO/KC の遊離

前述したように、 α 毒素は肺での好中球集積作用を有するが(Fig. 5)、この作用に IL-8 が関与しているかどうかは不明である。マウスにおいて、ヒト IL-8 のホモログとして GRO (growth-related oncogene) と KC (keratinocyte-derived cytokine) が知られており (43)、それぞれ CXC サブファミリーに属するケモカインである。GRO/KC は、マウスの好中球の走化性を亢進する機能を有しており、炎症初期のマウスの好中球の遊走や浸潤に関与することが知られている。そこで、本節では、本毒素の好中球集積における IL-8 の役割を検討するため、マウスにおいて IL-8 に相当するサイトカインである GRO/KC を指標として解析した。

【実験材料及び実験方法】

1) α 毒素の精製及び調製

A) 培地の作製

<実験材料>

1 M 硫酸マグネシウム溶液 ($MgSO_4$) の調製: $MgSO_4$ [Nacalai tesque, 210-32, M.W. 120.37] 12.0 g を蒸留水 100 ml に溶解した。

1 N 水酸化ナトリウム (NaOH) の調製: ガラスシリンダーを使用して、NaOH [Nacalai tesque, 31511-05, M.W. 40.00] 40.0 g を蒸留水 1,000 ml に溶解した。

<実験方法>

Luria-Bertani Broth 培地 (L-Broth) の調製: Bacto™ Tryptone [Difco, 211705] 10.0 g、Bacto™ Yeast Extract [Difco, 212750] 5.0 g、及び、塩化ナトリウム (NaCl) [Nacalai tesque, 31320-76, M.W. 58.44] 5.0 g を蒸留水に溶解し、1 M $MgSO_4$ 1.0 ml を加え、1 N NaOH で pH 7.5 に調整し、蒸留水で全量を 1,000 ml にした後、オートクレーブで、121°C、20 分間、高圧蒸気滅菌し、室温まで冷却した。

B) オクタロニー法

<実験材料>

PBS(-)の調製: NaCl 4.0 g、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 (Na_2HPO_4) [Nacalai tesque, 31723-35, M.W. 358.14] 1.45 g、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) [Nacalai tesque, 28721-55, M.W. 136.09] 0.1 g、塩化カリウム (KCl) [Nacalai tesque, 28514-75, M.W. 74.55] 0.1 g を蒸留水 500 ml に溶解し、オートクレーブで、121°C、20 分間、高圧蒸気滅菌し、室温まで冷却した。

抗 α 毒素血清 (H148G 血清) の調製: Nagahama らの方法に従って作製した変異 α 毒素 (H148G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を等容量 (1,000 μl) の完全アジュバント [Difco, 0638-60-7] と混和し乳化した。この乳化液をウサギ (ニュージーランドホワイト, 雄, 約 3.0 kg) の両側後肢に 2 週間間隔で筋肉注射した。さらに、約 2 週間後、ウサギ耳外縁部静脈より、約 50 ml 採血し、血液が完全に凝固するまで、4°C で放置した。次に、血餅を除くため、3,000 rpm、10 分間遠心し、得られた上清を抗毒素血清とした。

<実験方法>

寒天末 [Nacalai tesque, 01028-85] 0.9 g に PBS(-) 100 ml を加え、沸騰水浴中で完全に溶解させた。その後、この溶解液を室温で放置して 60°C 付近まで冷却した後、1% チメロザール [Sigma, T-5125] 100 μl を加え、ガラスシャーレに約 6 mm の厚さになるように流し込み、室温にて凝固させた。固化した寒天に直径約 5 mm の穴を開け、抗原、及び、抗血清をそれぞれ 10 μl 添加し、37°C で約 16 時間インキュベーション後、沈降線の有無を観察した。

C) ラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

<実験材料>

6 N 塩酸 (HCl) の調製: HCl [Nacalai tesque, 18320-44, M.W. 36.46, 4 kg] 540 ml をガラスシリンダーに量り、蒸留水を加えて全量を 1,000 ml とした。

泳動槽用緩衝液の調製 : 0.3% トリス-1.44% グリシン-2% SDS 水溶液: トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) [Nacalai tesque, 35434-34, 121.14] 3.0 g、グリシン [Nacalai tesque, 17109-35, M.W. 75.07] 14.4 g、そして、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) [Nacalai tesque, 316-07, M.W. 288.38] 20.0 g を蒸留水 1,000 ml に溶解した。

A 溶液の調製 : 30 % アクリルアミド溶液: アクリルアミド [Nacalai tesque, 00809-85, M. W. 71.08] 29.2 g、N, N'-メチレンビスアクリルアミド (Bis) [Nacalai tesque, 22402-02, M.W. 154.17] 0.8 g を蒸留水 100 ml に溶解した。

B 溶液の調製 : 0.4 % SDS-1.5 M Tris 緩衝液 (pH 8.8): Tris 18.2 g、SDS 0.4 g を蒸留水に溶解し、6 N HCl で pH 8.8 に調整後、蒸留水で全量を 100 ml とした。

C 溶液の調製 : 0.4 % SDS-0.5 M Tris 緩衝液 (pH 6.8): Tris 6.1 g、SDS 0.4 g を蒸留水に溶解し、6 N HCl で pH 6.8 に調整後、蒸留水で全量を 100 ml とした。

D 溶液の調製 : 10 % 過硫酸アンモニウム: 過硫酸アンモニウム [Nacalai tesque, 026-02] 0.1 g を蒸留水 1.0 ml に溶解した。

0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (TB) (pH 6.8) の調製: Tris 24.2 g を蒸留水に溶解し、6 N HCl で pH 6.8 に調整後、蒸留水で全量を 1,000 ml とした。

2% SDS-sample buffer: 少量の 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) に Sodium Lauryl Sulfate Granular (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) [Nacalai tesque, 31607-65] 2.0 g、Glycerol [Nacalai tesque, 17018-83] 10 ml、2-Mercaptoethanol [Wako, 138-01015] 5.0 ml を加えて溶解し、0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) で全量を 100 ml とした。

1% Coomassie Brilliant Blue R-250 溶液の調製: Coomassie Brilliant Blue R-250 [Nacalai tesque, 09408-52] 10 mg を蒸留水 1.0 ml に溶解した。

Coomassie 染色液の調製 (解析時): Coomassie Brilliant Blue R-250 1.0 g を Methanol [Nacalai tesque, 21915-93] 20 ml、酢酸 [Nacalai tesque, 00212-43] 30 ml、そして、蒸留水 350 ml で溶解後、FILTER PAPER 1 185 mm [ADVANTEC]を用いて濾過した。

脱色液の調製 : 25% メタノール-7% 酢酸水溶液: 酢酸 75 ml、メタノール 250 ml に、蒸留水を加えて全量 1,000 ml とした。

分子量マーカー: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder [Maestrogen, 02102-250]

Hanks balanced solution (-CaCl₂): HBS(-)の調製: KCl 0.4 g、KH₂PO₄ 0.06 g、NaCl 8.0 g、Na₂HPO₄ 0.107 gを700 mlの蒸留水に溶解し、1 N NaOHでpH 7.4に調整後、蒸留水で全量を1,000 mlとした。

ラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルの作製: 蒸留水 3.0 ml、A 溶液 3.75 ml、B 溶液 2.25 ml、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) [Nacalai tesque, 33401-72] 5.0 µlを加え混和し、20分間脱気後、D 溶液 35 µlを加え穏やかに攪拌し、予め組み立てておいたゲル板 [日本エイドー株式会社, NA-1000-4]に流し込み、このゲルの上に蒸留水を静かに重層し、50 °Cで30分間固化させた。次に、蒸留水 1.8 ml、A 溶液 0.45 ml、C 溶液 0.75 ml、TEMED 5.0 µl、を混和し、D 溶液 9.0 µlを加え、攪拌後、直ちに、固化した分離ゲル上に積層し、コーム (10 ウェル用)を差し込み、50 °Cで30分間固化させた。

<実験方法>

試料に等量の SDS sample buffer 溶液を混和し、沸騰水浴中で3分間処理後、軽くスピンドウンし、1% Coomassie Brilliant Blue R-250 溶液 1.0 µlを加えた。この試料溶液をミニスラブディスク電気泳動装置 [日本エイドー株式会社, NA-1012] にセットした電気泳動ゲルにアプライし、60 mA、約30分間電気泳動した。ゲルを染色液で約20分間振とう染色後、脱色液で振とう脱色した。

D) α 毒素の精製法

<実験材料>

0.02 M TB (pH 7.5) の調製: Tris 2.4 gを蒸留水に溶解し、6 N HClでpH 7.5に調整後、蒸留水で全量を1,000 mlとした。

0.02 M TB (pH 8.0) の調製: Tris 2.4 gを蒸留水に溶解し、6 N HClでpH 8.0に調整後、蒸留水で全量を1,000 mlとした。

<実験方法>

枯草菌 α 毒素遺伝子トランスフォーマントを L-Broth 中で攪拌しながら 37°C、14 時間培養後、4°C、8,000 rpm、20 分間遠心し、培養上清を氷冷下で攪拌しながら、硫酸アンモニウム (硫安) [Nacalai tesque, 02619-86] を定期的に少量ずつ添加後、終濃度 70%飽和硫安 (450 g/l) とし、一晩放置した。その後、4°C、9,500 rpm、30 分間遠心し、生じた沈査を 0.02 M TB (pH 7.5) に溶解させ、2,000 ml の同緩衝液で 2 回 4°C、一晩 Dialysis membrane, size 8 [Wako, 548-00033] を用いて透析した。透析後、4°C、15,000 rpm、30 分間遠心し、この上清を粗毒素 (硫安毒素) 標品とした。この粗毒素標品を終濃度 0.5 M NaCl となるように、1 M NaCl-0.02 M TB (pH 7.5) で希釈後、予め、0.5 M NaCl-0.02 M TB (pH 7.5) で平衡化した銅キレートアフィニティーカラム (1.5×9 cm) に粗毒素標品をアプライし、続いて、0.5 M NaCl-0.02 M TB (pH 7.5)、0.5 M NaCl-0.1 M PB (pH 6.5)、0.5 M NaCl-0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)、そして、0.5 M NaCl-0.1 M PB (pH 6.5) を順次、100 ml ずつ流した。次に、カラム中に結合した毒素を 15 mM L-ヒスチジン [Nacalai tesque, 18116-34, M.W.155] - 0.5 M NaCl-0.1 M PB (pH 6.5) 100 ml で溶出させた後、この溶出液をシリンジフィルター [DISMIC-ADVANTEC, 39122120] でろ過後、限外ろ過フィルター Amicon[®] Ultra-15-30K [MILLIPORE, UFC 903024] で遠心濃縮し、この濃縮液を 0.02 M TB (pH 8.0) で 4°C、一晩透析し、15,000 rpm、30 分間遠心後、Poros HQ/20 4.6mmDx100mm Column [Applied Biosystems, 1-2322-26] にアプライした。その後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)-AKTA purifier (GE healthcare) を用いて、毒素を精製した。各溶出 (0.5 ml) 画分において、抗 α 毒素血清に対するオクタロニー反応で沈降線が認められ、かつ、SDS-PAGE で、 α 毒素に相当する約 43 kDa の単一バンドを含む画分を集め、約 1.0 ml まで濃縮した。この濃縮液を 0.02 M TB (pH 7.5) で 4°C、一晩透析した後、4°C、15,000 rpm、30 分間遠心し、その上清 (α 毒素) を分取した。得られた α 毒素は、SDS-PAGE で不純物の有無を確認後、使用まで -20°C で保存した。

E) α 毒素のタンパク定量、及び、調製法

<実験材料>

プロテインアッセイ ビシニコニン酸キット: Protein assay bicinchoninate kit [Nacalai tesque, 06385-00]

2.0 mg/ml ウシ血清アルブミン標準溶液: Albumin, bovine, solution (2.0 mg/ml) for protein assay [Nacalai tesque, 00653-31]

Gelatin-Tris-buffer-saline (GTBS) の調製: Gelatin powder [Merck, 1.04070.0500]

1.25 gを、蒸留水約 200 mlに加え、煮沸水浴中でGelatinを完全に溶解させ、そして、室温まで冷やした溶媒を Gelatin 溶媒として作製する。次に、0.2 M TB (pH 7.5) 50 mlに、NaCl 4.5 gを添加後、Gelatin 溶媒を加え、よく攪拌する。マイヤー内を共洗いしながら、蒸留水で全量 500 mlとする。

<実験方法>

ビシニコニン酸法

終濃度 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml のアルブミン溶液を作成し、これを標準液とした。試料溶液は予め適当な濃度に希釈しておく。種々の濃度の標準液、または、試料溶液 25 μ l を micro plate に添加し、Working Solution 200 μ l を加え、37°C、30 分間インキュベーション後、吸光度 (562 nm) を測定した。標準液の吸光度から作成した検量線から試料溶液のタンパク量を算出した。濃度決定した α 毒素を GTBS で希釈し調製した。

F) LPS 除去

<実験材料>

LPS 除去キット: Endo Trap[®] red 1/1 [Hyglos GmbH, 321053]

<実験方法>

毒素を 10 mg/ml となるように Endo Trap[®] 平衡化緩衝液 (EB) で希釈した。Kit 内の

カラムを試験管ラックに固定し、上部のキャップを外した後、底部のキャップを外し、カラム内の保存液をカラムから溶出させる。以下、低温室で操作を行う。カラムを Endo Trap[®] 再生化緩衝液 (RB) 4.0 ml (4°C) で 2 回洗浄し、さらに、EB 4.0 ml (4°C) で 2 回洗浄する。その後、希釈した毒素 (10 mg/ml) をカラムに注入する (溶出液を豆試験管に回収 [1 本目])。PBS 1.0 ml を添加し、豆試験管に回収する作業を 4 回繰り返す [2~5 本目] (多くの場合、3~4 本目にほしいタンパクが溶出される)。EB 4.0 ml (4°C) で 2 回洗浄する。底部にキャップを付け、0.02% アジ化ナトリウム in RB (0.2 mg アジ化ナトリウム [Nacalai tesque, 312-33] / 1.0 ml RB) を注入して、4°C で保存する。

2) α 毒素による肺への好中球集積

< 実験材料 >

日本薬局方 生理食塩液 (大塚生食注): 20 ml プラスチックアンプル入りの大塚生食注を使用した。

抗マウス GRO/KC 抗体の調製: Anti-Mouse KC Rabbit IgG [IBL, 18361] を 50 μ g/0.1 ml となるように、大塚生食注で調製した。

< 実験方法 >

1 群 3 匹の ICR 系マウス (5 週齢、雄、25-30 g) に、 α 毒素 (50 ng) を 0.1 ml または、生理食塩水を 0.1 ml、抗マウス GRO/KC 抗体 50 μ g と α 毒素 (50 ng) 混合液 0.1 ml を尾静脈内投与した。その 3 時間後、脱臼屠殺したマウスから肺を摘出し、10% 中性ホルマリン緩衝液 [Wako, 060-01667] で、24 時間室温で固定した。その後、組織の切り出しを行い、サクラロータリー RH-12 で組織をパラフィン浸透し、エンベディング・コンソール・システムを用いてパラフィン包埋を行った。作製したパラフィンブロックをサクラ滑走式マイクロームで厚さ 4 μ m に薄切し、パラフィン伸展器で一晩伸展させた。その後、好中球及び組織構造の全体像を把握するため、H.E. 染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

3) α 毒素によるマウス血清中 GRO/KC 濃度の測定

<実験材料>

Mouse GRO/KC ELISA: Mouse GRO/KC assay kit [IBL, 27137]を用いて測定した。

<実験方法>

1 群 3 匹の ICR 系マウス(5 週齢、雄、25-30 g)に、 α 毒素(10, 50, 100 ng/mouse)を 0.1 ml または、生理食塩水を 0.1 ml を尾静脈内投与した。その 3 時間後、末梢血を採取し、15,000 rpm、10 分間で遠心分離し、血清を得た。アルブミン除去キット [Calbiochem, 122640]を用いて、血清中のアルブミンを除去した。各ウェルに、種々の濃度の標準基質液、あるいは、サンプルを 50 μ l ずつ入れ、さらに、ビオチン標識抗体試薬を 50 μ l 添加し、ゆっくりとサスペンション後、プレートにカバーをかけ、室温で 2 時間インキュベーションした。その後、洗浄液で 5 回洗浄し、ストレプトアビジン-HRP 混合液を 100 μ l ずつ添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。さらに、洗浄液で 5 回洗浄後、遮光しながら、TMB 基質溶液を 100 μ l ずつ添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。最後に、反応停止液を 100 μ l ずつ添加し、30 分以内にマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した(450-550 nm)。標準基質液の直線グラフから各サンプルのサイトカイン遊離量を算出した。

【実験成績】

α 毒素による肺への好中球集積作用に IL-8 が関与するかどうかを検討するために、マウスにおいてヒト IL-8 のホモログとして知られるマウス GRO/KC を指標として解析した。Fig. 6A に示すように、ICR マウスに、生理食塩水、 α 毒素 (50 ng) または、抗マウス GRO/KC 抗体 50 μ g と α 毒素 (50 ng) 混合液を尾静脈内投与し、3 時間後における肺組織中の好中球数を顕微鏡像からカウントした。その結果、本毒素投与により肺組織中の好中球数は、生理食塩水投与マウスと比較して著しく増加した。これに対し、抗マウス GRO/KC 抗体と本毒素を同時投与した群では肺への好中球集積は有意に減少した。すなわち、抗 GRO/KC 抗体の投与により、本毒素による肺への好中球集積が抑制されることが判明した。次に、種々の濃度の α 毒素を尾静脈内投与し、3 時間後に血清中 GRO/KC を測定した。その結果、本毒素の投与濃度に依存して GRO/KC の遊離量が増加した (Fig. 6B)。これらの結果より、 α 毒素は、マウスに作用して GRO/KC の遊離を促進し、肺への好中球集積を惹起することが明らかとなった。すなわち、 α 毒素による肺への好中球集積は、IL-8 遊離に起因すると考えられる。

第二節 α 毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離と TrkA の関係

前節の結果より、 α 毒素は、生体内で GRO/KC、すなわち、IL-8 を遊離して好中球の活性化を惹起することが明らかとなった。一方、所属する研究室では、 α 毒素によるウサギ好中球からの活性酸素産生作用には、好中球の細胞膜に存在する TrkA 受容体が関与することを報告している(34)。本節では、肺組織に対する α 毒素の作用を明らかにするため、肺の上皮細胞モデルとして、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いて、 α 毒素による IL-8 遊離と TrkA の関係を検討した。

【実験材料及び実験方法】

1) 細胞培養法 (A549 細胞)

<実験材料>

血清の非動化: 4°C で溶解した Fetal Bovine Serum [AusGENEX] 500 ml を 56°C で時々攪拌させ 30 分間 (血清が温まってから) インキュベーションを行い、非動化後、クリーンベンチ内で Corning Incorporated [Corning, 431160]を使用し、滅菌メディウム瓶 200 ml に 2 本と 100 ml に 1 本をそれぞれ濾過滅菌した。保存は-80 °C で行い、使用前日に低温室で溶解した。

10% Fetal bovine serum (FBS) - Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM (DMEM)

(FBS/DMEM): D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red [Nacalaitesque, 08458-45] 500 ml に、クリーンベンチ内で、Penicillin-Streptomycin [GIBCO, 15140-122] 5.6 ml、及び、非動化した Fetal Bovine Serum [AusGENEX] 60 ml を添加し、よく混和した。保存は、4°C で行い、使用前に予め室温に戻した。

<実験方法>

凍結細胞の植え継ぎ

-80°C で 2.0 ml セラムチューブに凍結保存された細胞を取り出し、直ちに 37°C の恒温槽に入れよく振り混ぜながら急速に解凍した。50%イソプロパノールでセラムチュ

ープの蓋を拭き、1.0 ml の滅菌ピペット [Greiner bio-one, 604181] を用いて、予め 4.0 ml の FBS/DMEM 培地が入ったポリプロピレンテストチューブ (PP-キャップ) [Greiner bio-one, 188271] に移した。軽く転倒混和し、25°C で 1,000 rpm、5 分間遠心した。乾熱滅菌済み滅菌パスツールピペットで上清を除去し、3.0 ml の FBS/DMEM 培地で懸濁後、予め 10 ml の FBS/DMEM 培地が入った 75 cm² の組織培養用フラスコ (Cell Culture Flasks) [greiner bio-one, 658-170] に全量を接種した。蓋を閉め、軽く混和し 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーター [SANYO, MCO-20AIC] を用いて培養した。

細胞の継代培養

75 cm² 組織培養用フラスコで培養 (90%以上増殖) した細胞を、クリーンベンチ内で乾熱滅菌済み滅菌パスツールピペットを用いて、アスピレーターで培地を吸引除去後、0.5% - Trypsin / 5.3 mM - EDTA Solution [Nacalai tesque, 35556-44] 0.5 ml を添加し、細胞が完全に剥離したのを確認後、5.0 ml の FBS/DMEM 培地で懸濁し、ポリプロピレンテストチューブに移した。25°C で 1,000 rpm、5 分間遠心した。乾熱滅菌済み滅菌パスツールピペットで上清を除去し、5.0 ml の FBS/DMEM 培地で懸濁後、予め 13 ml の FBS/DMEM 培地が入った 75 cm² 組織培養用フラスコに 0.5 ml 接種し、軽く混和し、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。以後、継代培養は、75 cm² 組織培養用フラスコを使用する。

<使用したプレート>

- ・付着細胞用 12 well プレート [greiner bio-one, 665 180] → 1.0 ml ずつ接種
- ・付着細胞用 24 well プレート [greiner bio-one, 662 160] → 0.4 ml ずつ接種
- ・付着細胞用 48 well プレート [greiner bio-one, 667 180] → 0.3 ml ずつ接種
- ・付着細胞用 96 well プレート [greiner bio-one, 655 180] → 0.2 ml ずつ接種
- ・ガラスボトムディッシュ [MATSUNAMI, D11131H] → 0.3 ml ずつ接種
- ・3.5 cm シャーレ [SUMILON, MS-10350] → 3.0 ml ずつ接種
- ・6 cm シャーレ [FALCON, 725-28-41-22] → 5.0 ml ずつ接種

細胞の培地交換

培地の色が赤色からやや黄色に変化し始めたら (約 3 日)、クリーンベンチ内で、培地をアスピレーターで吸引除去し、予め室温に戻した FBS/DMEM 培地 13 ml を静かに添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

細胞の凍結保存

75 cm² の組織培養用フラスコで培養 (90 %以上増殖) した A549 細胞を、クリーンベンチ内で乾熱滅菌済みパスツールピペットを用いて、アスピレーターで培地を吸引除去した。Trypsin-EDTA 0.5 ml を添加し、37 °C、5 % CO₂ の条件下で 3 分間インキュベーションした。細胞が完全に剥離した後、5.0 ml の培地で懸濁し、15 ml の PP-チューブに移し、25 °C で遠心 (1,000 rpm、5 分間) した。上清を除去し、細胞凍結保存液セルバンカー1^{プラス} [日本全薬工業, 804010] 1.0 ml で細胞を懸濁した。この懸濁液をセラムチューブに移し、-80°C で保存した。

2) A549 細胞からの IL-8 遊離

< 実験材料 >

Human IL-8 の検出: Human IL-8 ELISA kit [R&D systems, D8000C]を用いて検出した。

洗浄液の調製: 洗浄液を超純水で 25 倍に希釈した。

Substrate Solution: Color Reagents A と Color Reagents B を使う 15 分以内に等量混ぜる。

標準基質液の調製: 5つのエッペンドルフチューブ [BM Bio®, BM-15] に標準基質希釈液 (Calibrator Diluent RD5P) を 150 µl 入れる。IL-8 スタンダードを標準基質希釈液 5.0 ml で溶解し (2,000 pg/ml)、それを 150 µl、エッペンドルフチューブに移し、溶解した (1,000 pg/ml)。さらに、150 µl を別のエッペンドルフチューブに加え溶解した (500 pg/ml)。さらに、150 µl を別のエッペンドルフチューブに加え溶解し (250 pg/ml)、さらに、150 µl を別のエッペンドルフチューブに加え溶解し (125 pg/ml)、さらに、150

μl を別のエッペンドルフチューブに加え溶解した (62.5 pg/ml)。

<実験方法>

各ウェルに、Assay Diluent RD1-85を100 μl、そして、種々の濃度の標準基質液、あるいは、サンプルを50 μl 入れ、プレートにカバーをかけ、室温で2時間インキュベーションした。その後、洗浄液で4回洗浄し、Conjugateを100 μl ずつ添加後、プレートをカバーし、室温で1時間インキュベーションした。次に、洗浄液で4回洗浄し、調製したSubstrate Solutionを200 μl ずつ添加し、プレートにカバーをかけ、室温で30分間インキュベーションした。最後に、反応停止液を50 μl ずつ添加し、30分以内にプレートリーダー [Softmax pro] で吸光度を測定し (450 nm – 540 nm)、標準基質液の直線グラフから、各サンプルのIL-8遊離量を算出した。

IL-8 遊離量 (pg/ml) = (x-0.135) / 0.0016 (x は 2 つの吸光度の差)

3) A549 細胞中リン酸化 TrkA の検出

<実験材料>

抗リン酸化抗体用 Blocking buffer: Blocking one-P [Nacalai tesque, 05999-84]をTBS-Tween 20 で20倍希釈して使用した。

抗P-TrkA抗体: Phospho-TrkA (Tyr490) antibody rabbit polyclonal IgG [Cell signaling, 9141]をBlocking one-P で1000倍希釈して使用した。

Phosphate buffer saline (PBS): Phosphate buffer saline (10X) (pH7.4) [Nacalai tesque, 27575-31] 50 ml と蒸留水 450 ml を混合して攪拌し、オートクレーブした。

ウサギ二次抗体: Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody [Cell signaling, 7074]をBlocking one-P で2,000倍希釈して使用した。

Western Blotting に用いる試薬

20 % Methanol buffer: Tris 6.0 g, Glycine 28.8 g を蒸留水に溶解し、Methanol 400 ml を加え、蒸留水で全量を2,000 ml とした。

TBS-Tween 20: NaCl 45.0 gを0.2 M TB 500 mlに溶解し、ポリオキシエチレン (20) ソ

ルビタンモノラウレート (Tween 20) [Wako, 166-21115] 5.0 ml を添加後、蒸留水で全量を 5,000 ml とした。

脱色液の調製:25% メタノール-7.5% 酢酸水溶液: 酢酸 75 ml、メタノール 250 ml に、蒸留水を加えて全量 1,000 ml とした。

<実験方法>

前日に、24 well プレートに播種した A549 細胞の培地を吸引し、無血清 DMEM 培地 300 μ l に交換し、37°C、1 時間インキュベーションした。その後、培地を吸引し、終濃度 1.0 μ g/ml の毒素入り無血清 DMEM 300 μ l に交換して、37°C、5 % CO₂ 条件下で種々の時間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を除去し、PBS 300 μ l で洗浄し(2 回行う)、SDS sample buffer 30 μ l でかきとり(2 回行う)、エッペンドルフチューブに移した。超音波 [BIORUPTOR] で沈殿を溶解後、3 分間煮沸したものをサンプルとした。

1% Coomassie brilliant blue を少量添加したサンプル 20 μ l と分子量マーカー 3.0 μ l を、Real gel plate (10 %, 12 W) [Gellex, SDB-521] にアプライした。30 mA で約 1 時間 SDS-PAGE を行った。この間に PVDF 膜 [Millipore, ISEQ26260] を Methanol で約 1 分間、次に、Methanol buffer で振とうした (最低でも Blotting 操作を始める 15 分前までに用意しておく)。

Western Blotting の方法

準備した PVDF 膜と SDS-PAGE 後のゲルを右図の順に張り合わせ、Methanol buffer 中で 60-80 mA で約 1.5-2 時間、室温で転写を行った (始めの 30 分位は電流が安定しないので注意)。転写後、PVDF 膜を TBS-Tween 20 で 5 分間洗浄 (2 回行う) 後、Blocking One-P 2.0 ml を用いて、ハイブリバック [コスモ・バイオ, S-1001] に入れ PVDF 膜をパックし、37 °C で 30 分間振とうした。30 分後に、パック中から取り出し、TBS-Tween 20 で 5 分洗浄し、この操作を 3 回繰り返した。その間に、Blocking One-P に一次抗体を溶解したものを用意し、洗浄が終わった PVDF 膜を一次抗体でパックし、4 °C (低温室)、O/N で振とうしながらインキュベーションした。翌日、パックした PVDF

膜を TBS-Tween 20 で 5 分間洗浄し (3 回繰り返す)、二次抗体を含む Blocking One 5.0 ml でパック後、37 °C で 1 時間振とうした。1 時間後にパックから取り出し、TBS-Tween 20 で 5 分間洗浄した (3 回繰り返す)。

※必要に応じて PVDF 膜を半分に切断し、一次抗体と二次抗体を半量で行った。

PVDF 膜の解析法

洗浄後の PVDF 膜をラップ上に移し、水分を取り、Immobilon western chemiluminescent HRP substrate の HRP substrate peroxide solution 250 μ l、HRP substrate luminol reagent 250 μ l [Millipore, WBKLS0100], 及び、滅菌蒸留水 500 μ l をよく混和した溶液を滴下し、約 1 分間放置した後、余分な水分を吸い取り、PVDF 膜を Image reader LAS-4000 mini [Fuji film] で解析した。解析後、PVDF 膜を染色用 CBB 染色液で染色し、脱色液を用いて脱色した。

4) A549 細胞の TrkA ノックダウン

A) トランスフェクト方法 (Neon)

< 実験材料 >

NeoNTM transfection system 100 μ l kit (192 Reactions) [MPK, 10096]

NeoNTM transfection system [MPK, 5000]

TrkA siRNA の調製

FlexiTube siRNA Hs_NTRK1_1 [QIAGEN, SI00038983]

FlexiTube siRNA Hs_NTRK1_2 [QIAGEN, SI00038990]

TrkA siRNA (1 nmol) を専用の RNAase-free water 100 μ l に溶解し、10 μ M の溶液に調製した。使用時まで -20°C で保存した。

Negative control siRNA: Control siRNA [QIAGEN, 1027280]

< 実験方法 >

あらかじめ 24well プレートに FBS/DMEM 培地 300 μ l を加えて 37 °C でインキュベーションしておく。継代回数の少ないコンフルエントに増殖した A549 細胞の 75 cm² 組織

培養フラスコを、Trypsin-EDTA 1.0 ml で処理し、細胞を剥離後、細胞数 1×10^6 を滅菌エッペン 2 つに調製し、3,500 rpm、5 分間遠心した。遠心の間、Neon 本体/ Neon ステーションをセットアップし、電源を ON にし、クリーンベンチ内において、3.0 ml の Electrolytic Buffer (Buffer E2 for 100 μ l Neon tip 用) を Neon チューブに添加し、機械にセットした(カチッと音がするまで押し込むが、押し込みすぎるとエラーが発生する)。遠心後、上清を出来るだけ吸引し、Resuspension buffer R を 100 μ l を加え(15 分以上放置すると細胞生存率の低下を招くので手早く作業を済ませる)、すぐに、各 si RNA を total 5 μ l となるように加えた。Neon ピペットに、100 μ l Neon tip を装着し、調製した液を懸濁して泡が入らないように充填した(泡が入るとトランスフェクトできない)。Neon ピペットのプッシュボタンを 2 段階目のストップ位置まで押すと、先端から金具が出てくるので、その金具でチップ上端の金色電極をはさむ。細胞懸濁液を充填後、Neon チューブを、セットした Neon ステーションに装着し、チューブにある溝とピペット横の突起を合わせ、カチッと音がするまで押し込み、本体スクリーン上でエレクトロポレーション条件を設定する。Start ボタンを押し、本体スクリーン上に“complete”が表示されていることを確認後、Neon ピペットを Neon ステーションから取り外す。クリーンベンチ内において、Neon ピペット中のサンプル全量を新しい滅菌エッペンに移し、培地 900 μ l を加えて良く攪拌する。その後、あらかじめ保温しておいた 24 well プレートに 100 μ l ずつ培地に播く。

B) TrkA ノックダウン効率の確認

<実験材料>

抗体用 Blocking buffer: Blocking one [Nacalai tesque, 03953-95] を TBS-Tween で 20 倍希釈して使用した。

抗 TrkA 抗体: Anti-TrkA antibody rabbit IgG[Abcam, ab8871] を Blocking one で 1,000 倍希釈したものを使用した。

<実験方法>

実験方法は、第一章第二節-3 に従った。

C) TrkA ノックダウン A549 細胞または K252a 処理 A549 細胞からの IL-8 遊離

<実験材料>

TrkA 阻害剤: K252a [CALBIOCHEM, #420297] 100 µg を DMSO 213.9 µl に溶解して 1 mM に調製した。

Human IL-8 の検出: Human IL-8 ELISA kit [R&D systems, D8000C]を用いて検出した。

<実験方法>

あらかじめ K252a(1, 5, 10 nM)で 1 時間前処理した A549 細胞または、TrkA ノックダウン A549 細胞を用いて、第一章第二節-2 に従い実験を行った。

5) TrkA ノックダウン A549 細胞における α 毒素の結合

A) Cy3-ラベル化 α 毒素の調製法

<実験材料>

Cy3 ラベル化試薬: Cy3TMmonofunctional reactive dye (Cy3) [GE Healthcare, PA23001]

Bio-Spin 6 カラム [BIO-RAD, 732-6002]

0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5): ホウ酸 [Nacalai tesque, 05215-05, M.W. 61.83] 1.85 g を蒸留水に溶解し、1 N NaOH で pH 8.5 に合わせ、全量を 300 ml に調製した。

<実験方法>

α 毒素の Buffer 交換

精製した H148G 毒素をフィルター付き遠心チューブに移し、調製したホウ酸緩衝液で満たした後、限外濾過によって、遠心濃縮 (3,500 rpm、約 20 分間) を 2 回行う。最終的には、タンパク濃度 10 mg/ml になるようにホウ酸緩衝液で調製する。

Cy3 ラベル化

Cy3TM monofunctional reactive dye をホウ酸緩衝液 100 μ l に溶解し、50 μ l ずつ試験管に分注する。さらに、 α 毒素 (10 mg/ml) 150 μ l を添加し、軽く混和後、アルミホイルで遮光、室温で、2 時間インキュベーションした。インキュベーション終了前に、Bio-Spin 6 カラム [BIO-RAD, 732-6002] を 3,000 rpm、5 分間遠心し、カラム内の SSC buffer を除く。インキュベーション後、準備した Bio-Spin カラムにサンプル 200 μ l を添加し、3,000 rpm、5 分間遠心する。溶出サンプルを新しい Bio-Spin カラムに添加し、再度遠心を行う。この溶出液を Cy3- α 毒素とし、遮光して、-20°C で保存する。

Cy3- α 毒素の確認

Cy3- α 毒素 5.0 μ l、及び、SDS-sample buffer 20 μ l を混合し、SDS-PAGE を行った後、UV 照射によって、 α 毒素に相当する 43 kDa のバンドを確認する。

B) Cy3-ラベル化 α 毒素の結合確認

< 実験材料 >

38% Glycine-0.27% NH₄Cl in PBS (活性基ブロック液): Glycine [Nacalai tesque, 17109-35] 0.038 g と Ammonium Chloride [関東化学, 01287-00] 0.027 g を PBS 10 ml に溶解した。

0.5% Triton X-100 in PBS (Permeabilization buffer): ポリエチレングリコールモノ-p-イソオクチルフェノール (Triton X-100) [Nacalai tesque, 25897-85] 50 μ l を PBS 10 ml に溶解した。

0.05% Triton X-100 in PBS (Wash buffer): Triton X-100 50 μ l を PBS 100 ml に溶解した。

Blocking buffer: BSA を PBS に 3% になるように溶解した。

4% Paraformaldehyde 固定液 (PFA 固定液) (MeOH 非含有) の調製: Paraformaldehyde [Nacalai tesque, 261-23] 4.0 g をマイヤーに移し、50 ml の PBS を加え、ドラフト内で 60°C 以下の恒温槽で、攪拌しながら温めた。20~30 分かけて 1 N NaOH をパストゥールピペットで約 3~5 滴ずつ白濁がとれるまでゆっくりと滴下し、目で

見て白濁が無くなるのを確認した (若干の浮遊物は認められたがそのまま使用)。冷水中で冷却後、PBSで全量を100 mlとした。メスアップ後、150 ml Bottle Top Filter w / 33 mm Neck [CORNING, 430624] で濾過滅菌し、エッペンドルフチューブに1.0 ml ずつ分注し、-30°C で保存した。使用前に予め室温に戻した。

4% -ParaformaldehydePhosphate 固定液 (PFA 固定液) (MeOH 含有) : 4% -ParaformaldehydePhosphate [Nacalai tesque, 09154-14]

Hoechst の調製 (核染色試薬): Hoechst 33342 solution [Dojindo,346-07951] を50 µl ずつ0.5 ml 遮光チューブに分注し、-20°C で保存した。その内の1本は、4°C に保存した。

<実験方法>

細胞の培養法は、第一章第二節-1 を参照した。siRNA 処理後、ガラスボトムディッシュに播種して48時間後の Negative-control A549 細胞または、TrkA ノックダウン A549 細胞を Cy3 ラベル化 α 毒素入り FBS/DMEM 培地 (終濃度 1.0 µg/ml) を添加後、37°C で15分間インキュベーションした。培地を除去後、PFA 固定液を150 µl 添加し、室温で15分間処理した。PBS で2回洗浄後、Hoechst33342 を PBS で1000倍に希釈したものを100 µl 添加し、室温で5分間処理した。処理後、PBS で3回洗浄後、PBS を1.0 ml 添加して、共焦点レーザー顕微鏡 [Nikon, A1Rsi-TiE-PFS-電動ステージ・ピエゾ Z-インテンシライト] (Oil / 60 倍レンズ) を用いて解析した。

6) α 毒素と TrkA の局在

<実験材料>

抗 TrkA 抗体: Anti-TrkA antibody rabbit IgG [Abcam, ab8871] を Blocking buffer で500倍希釈したものを使用した。

Alexa 488 ラベルウサギ抗体: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) 2.0 mg/ml [Molecular Probes, A11008]

100 µl ずつ0.5 ml の遮光エッペンドルフチューブに分注し、-20°C で保存した。その

内の1本は、4°Cで保存した。使用時に、Blocking bufferで200倍に希釈して使用した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1を参照した。実験方法は、第一章第二節-5-Bに従った。

【実験成績】

α 毒素が IL-8 の遊離を誘導するかどうかを検討するために、肺の上皮細胞モデルとして、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いて測定した。その結果、Fig. 7A に示すように、本毒素の処理濃度に依存して A549 細胞から IL-8 の遊離が増加した。一方、酵素活性欠損変異体 (H148G) 処理では、IL-8 の遊離は認められなかった。次に、Fig. 7B に示すように、本毒素は、時間依存的に A549 細胞からの IL-8 の遊離を誘導し、約 6 時間で最大となった。以上より、 α 毒素は、A549 細胞からの IL-8 の遊離を示し、その作用は、本毒素の酵素活性に依存することが判明した。これまでに、好中球(34)や PC12 細胞(35)に対する検討から、 α 毒素は細胞膜に存在する TrkA に作用することが明らかにされている。そこで、本毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離に、TrkA が関与するかどうかを検討した。まず、 α 毒素による A549 細胞の TrkA のリン酸化を測定した (Fig. 8A)。その結果、本毒素処理 1 分後から TrkA のリン酸化が認められ、約 15 分まで持続した。次に、 α 毒素による TrkA のリン酸化と IL-8 遊離の関係を検討するため、TrkA 阻害剤 (K252a) を前処理した A549 細胞からの α 毒素による IL-8 遊離を検討した。その結果、Fig. 8B に示すように、K252a の処理濃度に依存して、本毒素による IL-8 の遊離が抑制された。そこで、TrkA の役割をさらに検討するため、RNAi 法を用いて特異的に TrkA 発現が抑制した A549 細胞を作製した。Fig. 9A に示すように、TrkA 特異的 siRNA をトランスフェクトした A549 細胞では、Intact 細胞や Negative-control siRNA (NC-siRNA) をトランスフェクトした細胞と比較して、TrkA のバンドが減少しておりノックダウンが認められた。そこで、これらの細胞に α 毒素を作用させ、IL-8 の遊離を測定したところ、Intact または、NC-siRNA 処理細胞と比較して、TrkA をノックダウンした細胞からの IL-8 遊離は、大きく減少した (Fig. 9B)。

α 毒素と TrkA の関係をさらに明らかにするために、TrkA をノックダウンした細胞に対する毒素の結合を検討した。その結果、TrkA をノックダウンした A549 細胞では、Intact または、NC-siRNA 処理細胞と比較して、本毒素の結合が大きく低下していた (Fig. 9C)。次に、細胞膜上での α 毒素と TrkA の局在を調べるため、A549 細胞に

Cy3 ラベル α 毒素と Alexa488-ラベル抗 TrkA 抗体で処理後、細胞を固定して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Fig. 10A に示すように、Cy3 ラベル α 毒素、及び、TrkA は、細胞膜上に局在し、さらに、本毒素の一部と TrkA は細胞膜上で共局在していた。以上より、 α 毒素は部分的に TrkA に結合して作用すると考えられる。

第三節 α 毒素による IL-8 の遊離機構

前節より、 α 毒素は、TrkA に作用して IL-8 の遊離を促進することが判明した。これまでに、TrkA の下流シグナル分子として、ERK1/2 経路、及び、p38 MAPK 経路の存在が知られている(44-48)。そこで、 α 毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離に TrkA のいずれの下流シグナル分子が関与するかを検討した。

【実験材料及び実験方法】

1) α 毒素による A549 細胞の MAPK と ERK1/2 のリン酸化

<実験材料>

抗 p-ERK1/2 抗体: Phospho-p44/42 (Thr202/Thr 204) Antibody [Cell signaling, 9101] を Blocking one-P で 1000 倍希釈して使用した。

抗 ERK1/2 抗体: p44/p42 MAP Kinase Antibody [SIGMA, M5670] を Blocking one で 1000 倍希釈して使用した。

抗 p-p38 MAPK 抗体: Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody [Cell signaling, 9211] を Blocking one-P で 1000 倍希釈して使用した。

抗 p38 MAPK 抗体: p38 MAP Kinase Antibody [Cell signaling, 9212] を Blocking one で 1000 倍希釈して使用した。

抗 p-SAPK/JNK 抗体: Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody [Cell signaling, 9251] を Blocking one-P で 1000 倍希釈して使用した。

抗 SAPK/JNK 抗体: SAPK/JNK Antibody [Cell signaling, 9252] を Blocking one で 1000 倍希釈して使用した。

ウサギ二次抗体 : Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody [Cell signaling, 7074] を Blocking one で 2,000 倍希釈して使用した。

TrkA 阻害剤: K252a [Calbiochem, #420297] 100 μ g を DMSO 213.9 μ l に溶解して 1 mM に調製した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。実験方法は、第一章第二節-3 に従った。

2) MAPK と ERK1/2 のリン酸化と IL-8 遊離との関係

<実験材料>

ERK1/2 阻害剤: PD98059 in DMSO [Calbiochem, 513000] M.W.267.3

PD98059 を滅菌エッペンに 1.0 mg 量りとり、DMSO 374.1 μ l で溶解し、10 mM として調製した。

p38MAPK 阻害剤: SB203580 in DMSO [Calbiochem, 559389] M.W.377.4

SB203580 を滅菌エッペンに 1.0 mg 量りとり、DMSO 264.9 μ l で溶解し、10 mM として調製した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。実験方法は、第一章第二節-2 及び 3 に従った。

3) α 毒素による NF- κ B のリン酸化と IL-8 遊離

A) NF- κ B のリン酸化

<実験材料>

抗 p-NF- κ B 抗体: Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) antibody Rabbit IgG [Cell signaling, 3031] を Blocking one-P で 1,000 倍希釈して使用した。

抗 NF- κ B 抗体: Purified Mouse Anti-NF- κ B p65 [BD Biosciences, 610869] を Blocking one で 1,000 倍に希釈して使用した。

マウス二次抗体: Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody [Cell signaling, 7076]

Blocking one で 2,000 倍希釈して使用した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。実験方法は、第一章第二節-3 に従った。

B) NF- κ B 阻害剤による IL-8 遊離に対する効果

<実験材料>

NF- κ B inhibitor: BAY11-7082 [Calbiochem, 19542-67-7] MW: 207.2

BAY11-7082 を滅菌エッペンに 1.0 mg 量り、DMSO 482.6 μ l で溶解し、10 mM として調製した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。A549 細胞をあらかじめ BAY11-7082 (1, 5, 10 μ M) で 1 時間前処理した。以降の実験方法は、第一章第二節-2 に従った。

4) NF- κ B の局在と ERK1/2, p38MAPK 阻害剤の効果

<実験材料>

Alexa 546 anti-mouse IgG の調製 (Alexa 546 ラベル抗マウス二次抗体): Alexa Fluor[®] 546 goat anti-mouse IgG (H+L) (2.0 mg/ml) [Molecular Probes, A-11003]を 100 μ l ずつ 0.5 ml 遮光チューブに分注し、-20 °C で保存した。その内の 1 本は、4 °C に保存し、Blocking buffer で 200 倍に希釈して使用した。

SYTO[®] 16 の調製 (核染色試薬): SYTO[®] 16 green fluorescent nucleic acid stain (1 mM) [Molecular Probes, S-7578]を 50 μ l ずつ 0.5 ml 遮光チューブに分注し、-20 °C で保存した。その内の 1 本は、4 °C に保存し、Blocking buffer で 500 倍に希釈して使用した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。実験方法は、第一章第二節-5-B に従った。

細胞の固定処理後、PBS で wash を行い、Blocking buffer を 150 μ l 添加し、室温条

件下で 30 分間インキュベーションした。PBS で wash を行い、抗 NF- κ B 抗体を 150 μ l ずつ添加し 4 °C 条件下で一晩置いた。翌日、培地を除去し PBS で wash を行い、Alexa546-マウス抗体と SYTO[®] 16 を含む Blocking buffer を作製し、150 μ l ずつ添加し 4 °C で 1 時間インキュベーションした。処理後、PBS で 3 回洗浄後、PBS を 1.0 ml 添加して、共焦点レーザー顕微鏡 [Nikon, A1Rsi-TiE-PFS-電動ステージ-ピエゾ Z-インテンシライト] (Oil / 60 倍レンズ)を用いて解析した。

5) α 毒素による IL-8 mRNA 発現

A) RNA の抽出

<実験材料>

FastPureTM RNA Kit [Takara, 9190]

Lysis buffer の調製: 使用前に、ドラフト内で Lysis buffer 1.0 ml と 2-メルカプトエタノール 10 μ l を混和した。

Wash buffer の調製: Wash buffer のボトルにエタノール 3.0 ml を添加し、混和した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。6 well プレートに播種した A549 細胞を、クリーンベンチ内で滅菌済みチップを用いて培地を除去し、各ウェルに新鮮な FBS/DMEM 培地 1.0 ml に交換した。その後、 α 毒素 (1.0 μ g/ml)を添加し、37°C で、種々の時間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を除去し、PBS を 1.0 ml 添加し、軽く揺り動かしながら洗浄した。阻害剤処理の場合、各阻害剤で 37°C、1 時間前処理後、上記と同様に毒素処理を行った。次の操作から、コンタミネーションを防ぐため、手袋、マスクを着用し、プラッテ上を RNase AWAY [Molecular BioProducts, 7000]で拭き、ラップを敷いて行った。洗浄後、各ウェルに調製した Lysis buffer 350 μ l を添加し、セルスクレイパー [Sumiron, MS-93170]で細胞をかきとった。細胞溶解液をエコノブラインドタイプ・ホモジナイザー [TOP, 4326-03]でホモジナイズ処理後、微量遠心チューブに移し、軽くスピンドウンした。次に、Solubilization buffer 50 μ l を添加し、

vortex で混和後 (15 秒)、軽くスピンドウンした。さらに、エタノール 170 μ l を添加し、vortex で混和後 (1 分)、軽くスピンドウンした。これをライセートとした。ライセートを数回ピペッティング後、専用のカートリッジに全量添加し、室温で 10,000 rpm、1 分間遠心した。このとき、カートリッジ内にライセートが残る場合には、再度遠心操作を行った。廃液を除去し、カートリッジに調製した Wash buffer 750 μ l を添加後、室温で 10,000 rpm、1 分間遠心して、カートリッジを洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。洗浄後、カートリッジに、回収容器として微量遠心チューブを装着し、Elution buffer 50 μ l を添加後、室温で 4 分間インキュベーションした。その後、室温で 10,000 rpm、1 分間遠心し、total RNA を回収した。RNA 濃度は、ND-1000 Spectrophotometer [Nano Drop, 302-479-7707]を用い 260 nm における吸光度より定量化した。RNA の希釈液、及び、Blank には、Distilled Water DNase, RNase Free [Gibco, 10977-015]を用いた。

B) Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

<実験材料>

1X TE の調製: Tris 121.2 g、及び、エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム水和物 (EDTA-2Na) [Nacalai tesque, 151-30] 37.2 g を適量の蒸留水に溶解し、HCl で pH 8.0 に調整後、蒸留水で全量を 500 ml とした。その後、オートクレーブで、121 °C、20 分間、高圧蒸気滅菌し、室温まで冷やした (x100 TE)。その後、超純水で 1,000 倍に希釈した。

Primer ScriptTM One Step RT-PCR Kit Ver.2.0 [Takara, RR055A]

Primer の調製

IL-8 F-1 Primer (5' -TCTGCAGCTCTGTGTGAA GG-3')

IL-8 R-1 Primer (5' -TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA-3')

β -actin F-1 Primer (5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3')

β -actin R-1 Primer (5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3')

それぞれの Primer を適量の 1X TE に溶解して 100 μ M とし、1X TE に希釈して 20

μM に調製した。使用時まで-20 °C で保存した。

TAE buffer : 50X Tris-Acetate-EDTA buffer [関東化学, 46508-79] 20 ml を超純水 980 ml で全量を 1,000 ml とした。

エチジウムブロマイド溶液の調製: エチジウムブロマイド [Wako, 058-04761] 1.0 g を超純水 50 ml に加え、遮光して、一晚攪拌しながら溶解した (発ガン性があるため、手袋、マスクを着用した)。使用時は、蒸留水で 300~500 倍に希釈した。

2 % アガロースゲルの作製: アガロース LE [Nacalai tesque, 01157-95] 2.0 g を 1X TAE buffer 100 ml に加え、オートクレーブで、121°C、4 分間、加熱してアガロースを完全に溶解した。その後、アガロースを Mupid[®]-2 電気泳動装置 [コスモ・バイオ] のゲルメーカー板に流し込み、コームを差し込み室温で放置して完全に固化させた。使用まで、1X TAE buffer 中で保存した。

<実験方法>

以下の組成を IL-8、及び、β-actin のプライマーを用いてそれぞれ 0.2 ml チューブ [Takara, NJ202] に調製した。

試薬	使用量(μl)	終濃度
Prime script 1 step enzyme mix	2.0	
2 x 1 step buffer	25	
F-1 primer (20 μM)	1.0	0.4 μM
R-1 primer (20 μM)	1.0	0.4 μM
RNA(X μg/μl)	Y	1.0 μg
RNase free dH ₂ O	Total 50	

チューブを PCR Thermal Cycler [Takara] にセットし、下記のプログラムで RT-PCR を行った(50 °C で 30 分、94 °C で 2 分後、94 °C で 30 秒、60 °C で 30 秒、72 °C で 1 秒 /1 cycle で 28cycle)。

RT-PCR をかけたサンプルをそれぞれアガロースゲルにアプライし、Mupid[®]-2 電気

泳動装置を用いて、1X TAE buffer 中、100 V で 30 分間通電させた。泳動後、ゲルを調製したエチジウムブロマイド溶液で 30 分間染色した。染色後、蛍光イルミネーターを用いて、Color Image Freezer AE-6905C [ATTO]で RNA のバンドを確認した。

【実験成績】

TrkA の下流シグナルとして、ERK1/2 経路、及び、p38 MAPK 経路が知られている(44-48)。さらに、IL-8 遊離に MAPK カスケードの活性化が密接に関与していると報告されている(49-52)。そこで、 α 毒素が TrkA に作用後、MAPK カスケードを活性化させるかどうかを明らかにするため、本毒素による MAPK 系の活性化を種々の抗 MAPK リン酸化抗体を用いて検討した。Fig. 11A に示すように、 α 毒素処理により、ERK1/2、及び、p38 MAPK のリン酸化が 1 分後から認められ、30 分以上持続した。一方、SAPK/JNK のリン酸化は認められなかった。次に、TrkA と MAPK 系の関係を明らかにするため、TrkA 阻害剤(K252a)存在下で α 毒素による ERK1/2、及び、p38 MAPK のリン酸化を測定した。その結果、K252a を前処理した A549 細胞では、DMSO 処理と比較して、本毒素による ERK1/2、及び、p38 MAPK のリン酸化が抑制された(Fig. 11B, C)。さらに、 α 毒素による IL-8 遊離と MAPK 系の関係を明らかにするため、ERK1/2 阻害剤(PD98059)、あるいは、p38 MAPK 阻害剤(SB203580)で細胞を前処理し、 α 毒素を添加後、細胞からの IL-8 遊離とそれぞれのリン酸化を測定した。その結果、毒素による細胞からの IL-8 遊離、及び、リン酸化は、これら阻害剤の処理濃度に依存して抑制された(Fig. 11D, E)。従って、本毒素による IL-8 遊離には、ERK1/2、及び、p38 MAPK を介する MAPK 系の活性化が重要であることが判明した。

Walsh らは、MAPK 系が刺激されると、細胞内でそれに伴う NF- κ B の活性化、及び、核内移行が引き起こされ、IL-8 の転写活性が促進されると報告している(53)。そこで、NF- κ B の関与を検討するため、 α 毒素による NF- κ B のリン酸化を測定すると、Fig. 12A に示すように、約 1 分後からリン酸化が認められ、15 分後で最大となった。次に、NF- κ B と本毒素による IL-8 遊離の関係を調べるため、NF- κ B 阻害剤(BAY11-7082)で A549 細胞を前処理し、 α 毒素による IL-8 遊離を測定した。その結果、本毒素による IL-8 遊離は、BAY11-7082 の処理濃度に依存して有意に阻害された(Fig. 12B)。NF- κ B は、活性化されると核内に移行することが知られている。そこで、 α 毒素による活性化 NF- κ B の核内移行を蛍光抗体法で解析した。 α 毒素を A549 細胞に添加し、

37 °C で 15 分間インキュベーション後、細胞内の NF- κ B の局在を抗 NF- κ B 抗体と Alexa 546 ラベル抗体、さらに、細胞核を SYTO[®] 16 で二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、 α 毒素処理 15 分で核内に NF- κ B の移行している像が観察された (Fig. 13A)。さらに、本毒素による NF- κ B の核内移行は、MAPK 系を介しているかどうかを検討するために、あらかじめ PD98059、あるいは、SB203580 で細胞を前処理し、上述した方法に従って、 α 毒素による NF- κ B の核内移行を観察した。Fig. 13A に示すように、 α 毒素による NF- κ B の核内移行は、PD98059 前処理で阻害された。一方、SB203580 処理では、本毒素による NF- κ B の核内移行は阻害されなかった。以上より、 α 毒素による NF- κ B の核内移行は、ERK1/2 経路を介して誘導されていることが明らかとなった。

次に、NF- κ B の活性化による IL-8 mRNA の発現量を測定するため、 α 毒素を A549 細胞に添加し、種々の時間インキュベーション後、総 RNA を抽出した。その後、IL-8、あるいは、 β -actin のプライマーを用いて、IL-8 mRNA 発現量を RT-PCR で解析した。その結果、発現量は、本毒素処理 2 時間でピークに達した (データは示していない)。そこで、IL-8 mRNA の発現に関与する MAPK 系を解析するため、PD98059、あるいは、SB203580 で細胞を前処理し、 α 毒素で処理後、IL-8 mRNA の発現量を RT-PCR 法で解析した。その結果、本毒素を 2 時間処理すると mRNA の発現量は約 4 倍に増加した。この条件下で阻害剤の効果を検討すると、 α 毒素による IL-8 mRNA の発現量は、PD98059 処理では、IL-8 mRNA の発現量はコントロールレベルまで低下した。一方、SB203580 処理では、約 30% の IL-8 mRNA 発現量の阻害を示した (Fig. 14A)。Shimohata ら(54)は、IL-8 mRNA の安定化に p38 MAPK が関与すると報告している。そこで、本毒素により活性化された p38 MAPK が IL-8 mRNA の安定化に関与しているかどうかを検討した。あらかじめ、 α 毒素で 1 時間処理した A549 細胞に、mRNA 合成阻害剤 (actinomycin D) 共存下で、DMSO、または、SB203580 を添加し、種々の時間処理した。その後、上述した方法に従い、IL-8 mRNA の発現量を RT-PCR 法で解析した。その結果、SB203580 処理では、DMSO 処理と比較して、阻害剤処理約 2 時

間後で IL-8 mRNA 量の低下が認められた (Fig. 14B)。すなわち、p38 MAPK の阻害により、IL-8 mRNA が不安定になり、分解を受けやすくなると考えられる。次に、 α 毒素による細胞内での IL-8 の発現をタンパクレベルで解析し、さらに、MAPK 系との関係について検討した。A549 細胞を α 毒素で種々の時間インキュベーション後、細胞内で発現した IL-8 量を抗 IL-8 抗体による蛍光抗体法で測定した。Fig. 14C に示すように、本毒素処理した細胞では、約 2 時間で細胞内 IL-8 の発現量が最大となった。これに対して、 α 毒素による細胞内での IL-8 発現の増加は、PD98059 前処理でほとんど観察されなかった。一方、SB203580 前処理では、 α 毒素単独処理と比較して、細胞内での IL-8 の発現量は約 30%に低下した。以上の結果より、IL-8 の遺伝子発現に ERK1/2 を介するシグナル伝達が重要であること、さらに、IL-8 mRNA の安定化に p38 MAPK が関与することが明らかとなった。

第四節 考察および小括

【考察】

ウエルシュ菌感染の特徴的な所見は、感染組織周辺の血管内皮に好中球が集積することである。本章では、本菌感染によって誘導される血管内での好中球の集積に、 α 毒素がいかに関与しているかを詳細に解析した。まず、 α 毒素をマウスに投与したところ、肺や肝臓の血管内において、好中球の集積が認められたが、好中球の組織への浸潤は認められなかった。ケモカインである IL-8 は、好中球の遊走、及び、接着の活性化に重要な因子として知られている。そこで、本毒素による好中球の集積に、IL-8 が関与するかどうかを検討した。マウスにおいて、ヒトの IL-8 のホモログとして知られる(43)、マウス GRO、及び、マウス KC を指標とした。まず、 α 毒素をマウスに投与すると、血清中 GRO/KC が増加した。さらに、 α 毒素による肺組織中への好中球集積は、抗 GRO/KC 抗体の投与で抑制された。以上より、本毒素による好中球の集積に GRO/KC が関与することが明らかとなった。すなわち、 α 毒素は IL-8 の遊離を亢進し、好中球の集積を惹起すると推察された。

肺組織では主に、上皮細胞や内皮細胞などから IL-8 を遊離し、炎症時では、IL-8 の過剰な遊離が好中球を活性化し、重症化につながると報告されている(55)。そこで、 α 毒素による IL-8 遊離について詳しく検討するために、肺の上皮細胞モデルとして、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いて解析した。その結果、 α 毒素は A549 細胞からの IL-8 の遊離を促進した。一方、酵素活性欠損変異体 (H148G) では、この作用は示さないことから、毒素自身の酵素活性が重要であると推察された。これまでに、 α 毒素によるウサギ赤血球膜の破壊(31)、そして、ウサギ好中球(34)、PC12 細胞(35)に対する作用の検討から、本毒素は、チロシンキナーゼ関連受容体である TrkA を活性化することが判明している。そこで、 α 毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離に、TrkA が関与するかどうかを検討したところ、TrkA 阻害剤や TrkA をノックダウンした A549 細胞では、

本毒素による IL-8 遊離が抑制された。さらに、TrkA をノックダウンした A549 細胞では、 α 毒素の結合が低下した。一方、A549 細胞表面では、TrkA と α 毒素の共局在が認められた。すなわち、TrkA は本毒素の受容体としての可能性が示唆された。以上の結果より、 α 毒素は、A549 細胞の細胞膜表面に存在する TrkA に作用して、IL-8 の遊離を惹起することが判明した。加えて、 α 毒素の酵素活性が IL-8 の遊離に重要な役割を演じていることが推察された。

IL-8 の遊離は、刺激物質や因子によって様々な細胞内シグナル伝達経路を介して引き起こされる。例えば、宿主への細菌感染は、しばしば感染細胞から IL-8 を遊離させることが知られており、ネズミチフス菌(56)、ヘリコバクター・ピロリ菌(57-59)、腸管出血性大腸菌(60)、そして、腸管病原性大腸菌(61)は、上皮細胞に感染後、MAPK シグナル伝達系の活性化を介して IL-8 の遊離を誘導すると報告されている。また、TrkA の下流には、ERK1/2、及び、p38 MAPK 経路の存在が知られている(44-48)。そこで、 α 毒素による IL-8 遊離に MAPK シグナル伝達系が関与するかどうかを検討した結果、本毒素は ERK1/2、及び、p38 MAPK のリン酸化を示し、さらに、これらのリン酸化は、TrkA 阻害剤により阻害された。また、 α 毒素による IL-8 の遊離は、ERK1/2 阻害剤と p38 MAPK 阻害剤で抑制された。従って、 α 毒素は、TrkA に作用して、その下流シグナルの ERK1/2 経路、及び、p38 MAPK 経路を活性化し、IL-8 の遊離を惹起すると考えられる。

IL-8 の発現には転写因子である NF- κ B の活性化が関与していることが知られている(51, 62-64)。そこで、 α 毒素による IL-8 の遊離における NF- κ B の役割について検討すると、 α 毒素は NF- κ B を強くリン酸化し、さらに、NF- κ B 阻害剤で、本毒素による IL-8 の遊離が抑制された。一方、Karin ら(65)は、NF- κ B は、活性化により細胞核内に移動して IL-8 遺伝子のプロモーター上の結合領域に結合し、遺伝子転写を誘導すると報告している。本研究において、 α 毒素は NF- κ B の核内移行を強く誘導し、さらに、この核内移行に ERK1/2 が関与し、p38 MAPK は関与しないことが判明した。次に、 α

毒素を処理した A549 細胞での IL-8 mRNA 発現量を測定した。その結果、 α 毒素単独処理で IL-8 mRNA 発現量は著しく増加したのに対し、ERK1/2 阻害剤処理では、IL-8 mRNA の発現量はコントロールレベルまで低下した。また、p38 MAPK 阻害剤処理では、 α 毒素単独処理と比較して IL-8 mRNA 発現量の阻害を示した。以上より、本毒素は ERK1/2 経路を介して NF- κ B の核内移行を誘導し、その後、IL-8 の遊離を惹起することが判明した。一方、p38 MAPK は下流シグナル分子の p38 MAP kinase-activated protein kinase (MK-2) を介して活性化した Tristetraprolin (TTP) が IL-8 mRNA の AU-rich element (ARE) に結合して、IL-8 mRNA の安定化に寄与することが知られている(66, 67)。そこで、 α 毒素であらかじめ細胞を処理し、IL-8 mRNA 発現を誘導させ、その mRNA の安定性について解析すると、p38 MAPK 阻害剤処理で細胞内の IL-8 mRNA の分解が有意に増加した。すなわち、本毒素による p38 MAPK の活性化は、IL-8 mRNA の安定性に関与することが明らかとなった。次に、細胞内での IL-8 のタンパク質発現を観察すると、 α 毒素を処理した細胞では、細胞内 IL-8 タンパク質の発現量が大きく増加した。一方、ERK1/2 阻害剤処理では本毒素による細胞内 IL-8 タンパク質の発現量はコントロールレベルまで低下した。また、p38 MAPK 阻害剤では毒素単独処理と比較して細胞内 IL-8 タンパク質の発現量を約 70% 阻害した。従って、 α 毒素が作用する細胞膜上の TrkA の下流シグナル伝達系で、ERK1/2 は NF- κ B の核内移行を介して IL-8 の転写を活性化し、そして、発現した IL-8 mRNA の安定化には p38 MAPK を介するシグナル伝達が重要であると考えられる。

以上の結果より、Fig. 15 に示すように、 α 毒素は A549 細胞に結合後、TrkA に作用し、その下流 MAPK シグナルの ERK1/2、そして、p38 MAPK の両シグナル分子の活性化を誘導することが判明した。活性化した ERK1/2 は、IL-8 遺伝子の転写因子である NF- κ B の核内移行を誘導し、IL-8 mRNA の転写を惹起し、IL-8 の生成を誘発することが明らかとなった。一方、活性化した p38 MAPK は MK-2 の活性化により発現した

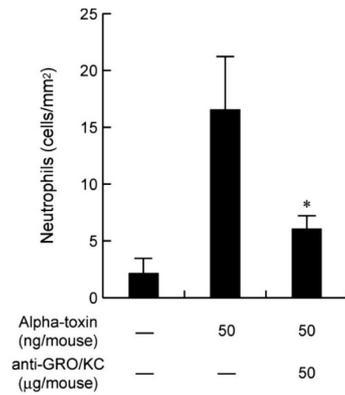
IL-8 mRNA の安定化に働いていると推察された。同様に、他の細菌感染症の場合、エルシニア菌感染症では ERK1/2、及び、p38 MAPK を活性化し、そして、腸炎ビブリオ菌の感染では、ERK1/2 経路を介する IL-8 の転写活性化、及び、p38 MAPK 経路を介する IL-8 mRNA の安定化が報告されている(54, 68)。すなわち、本毒素は細胞膜上の TrkA に作用後、ERK1/2、及び、p38 MAPK の両経路を活性化して、強力に IL-8 の遊離を促進し、ウエルシュ菌感染の重症化に寄与すると考えられる。

【小括】

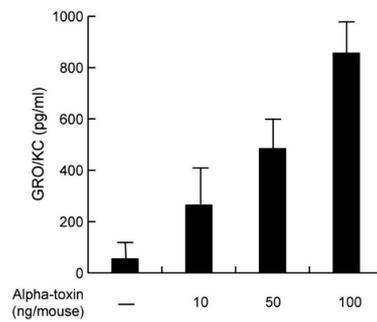
α 毒素は A549 細胞に結合後、TrkA に作用し、その下流シグナルの ERK1/2、そして、p38 MAPK の両経路の活性化を誘導することが判明した。活性化された ERK1/2 は、NF- κ B の核内移行を誘導し、IL-8 mRNA の転写を惹起し、また、p38 MAPK の活性化により、その mRNA が安定化される。その結果、IL-8 が著しく合成され、細胞外に遊離することが明らかとなった。以上より、本菌の感染による臓器への好中球の集積は、 α 毒素による IL-8 の遊離が引き金となることが判明した。

Fig. 6. Accumulation of neutrophils into the lung and release of GRO/KC in serum of mice treated with alpha-toxin.

A)



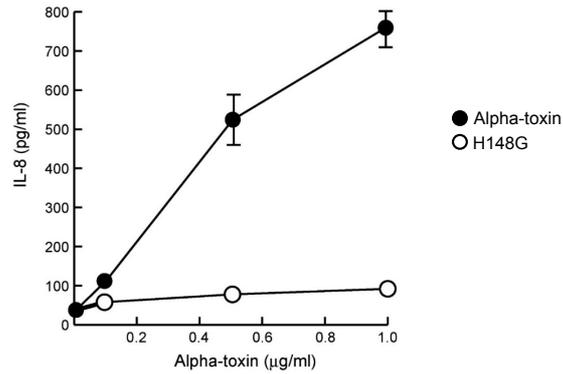
B)



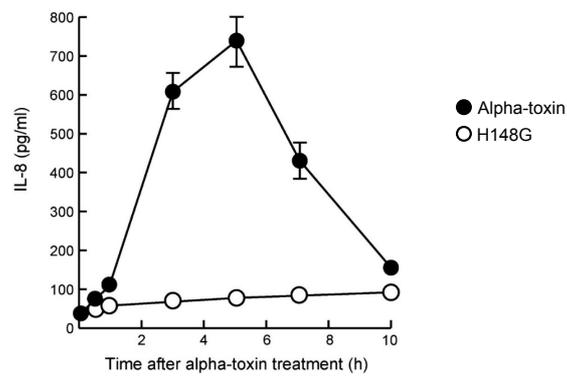
A) Mice were administrated with 50 ng of alpha-toxin/mouse. After 3 h, lung tissue was fixed in formalin and sections were stained with hematoxylin and eosin. The number of neutrophils in blood vessels of the lung was counted using light microscopy. The neutrophils of 50 vessels were counted from the images. The average number of neutrophils per mm² in the vessels was morphologically analyzed. Values represent the mean \pm SEM; $n = 3$; * $P < 0.01$, compared with the number of neutrophils in the lungs of mice treated with alpha-toxin. B) Mice were treated with various concentrations of alpha-toxin. After 3 h, GRO/KC in serum was measured by ELISA. Values represent the mean \pm SEM; $n = 3$ independent experiments

Fig. 7. Alpha-toxin-induced release of IL-8 from A549 cells.

A) Dose-response



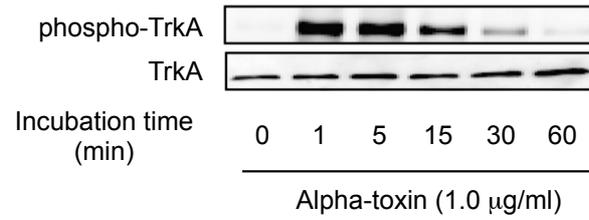
B) Time-course



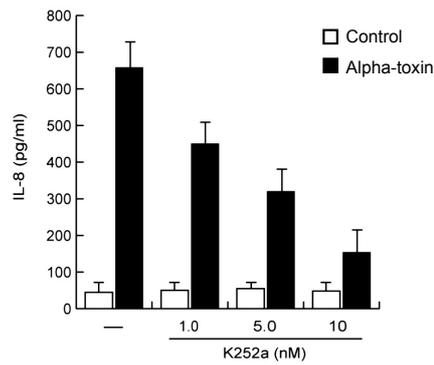
A) A549 cells (1.0×10^7 /ml) were incubated with alpha-toxin (black circles) or H148G (white circles) at 37°C for 5 h. B) The cells were incubated with 1.0 µg/ml alpha-toxin (black circles) or H148G (white circles) the toxin at 37°C for various periods. The amount of IL-8 in culture supernatants was determined by ELISA. Values represent the mean \pm SEM; $n = 4$ independent experiments.

Fig. 8. Relationship between release of IL-8 and phosphorylation of TrkA induced by alpha-toxin.

A)

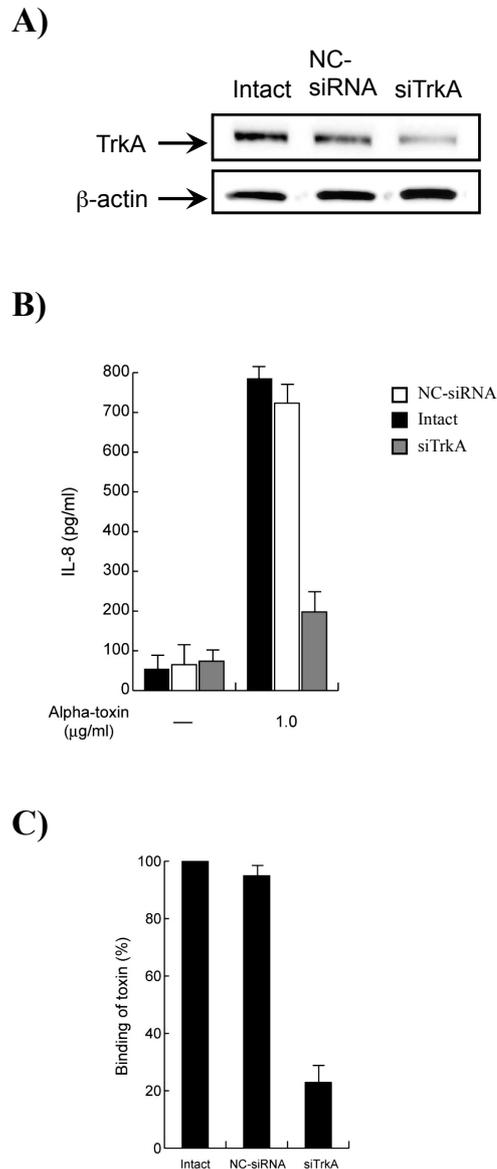


B)



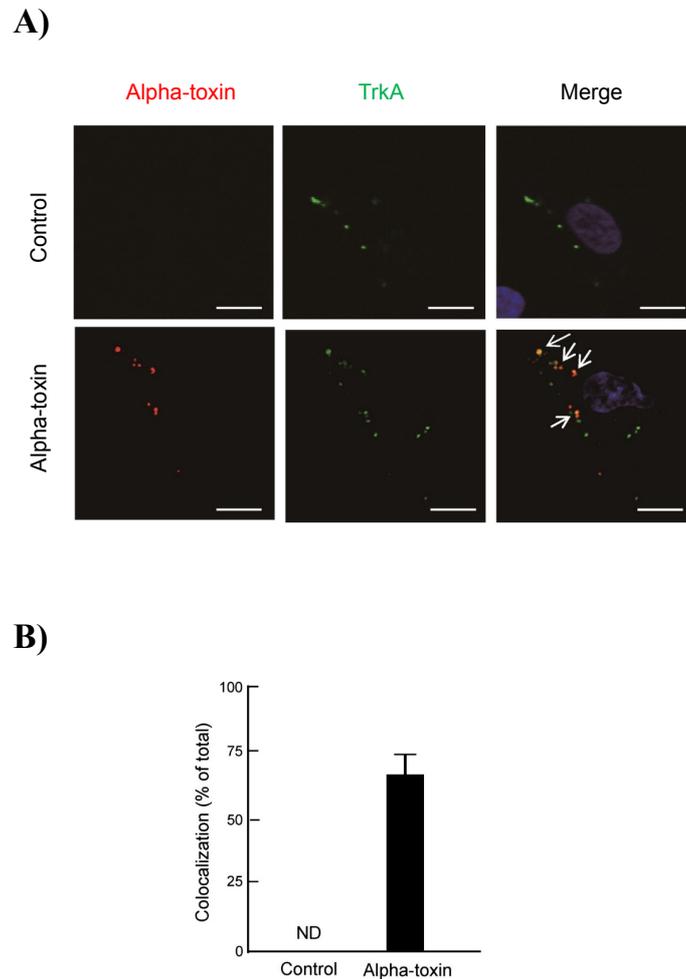
A) A549 cells (1.0×10^7 /ml) were incubated with alpha-toxin (1.0 µg/ml) at 37°C for various periods. The lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibody against phosphorylated TrkA. B) A549 cells (1×10^7 / ml) were pretreated with various amounts of K252a at 37°C for 1 h, and incubated with (black columns) 1.0 µg/ml alpha-toxin or without (white columns) the toxin at 37°C for 5 h. IL-8 in the culture supernatants was determined by ELISA. Values represent the mean \pm SEM; $n = 4$ independent experiments.

Fig. 9. Effect of siRNA for TrkA on release of IL-8 induced by alpha-toxin.



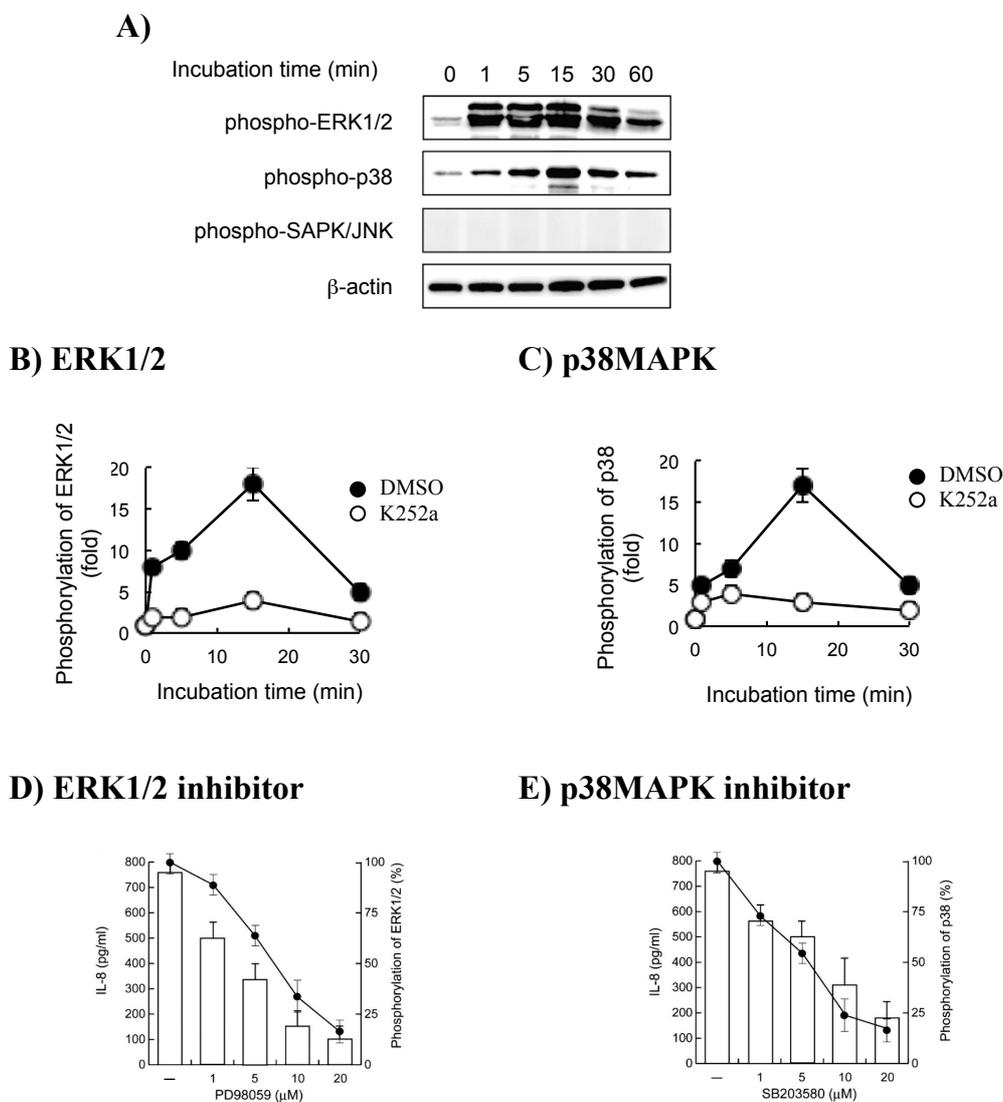
A549 cells were transfected with siTrkA or NC-siRNA (10 nM). A) The expression of TrkA in the cells treated with siRNA was detected by Western blotting using anti-TrkA antibody and anti- β -actin antibody. B) The intact cells (black columns), NC-siRNA-treated cells (white columns), or siTrkA-treated cells (gray columns) were incubated with 1.0 μ g/ml alpha-toxin at 37°C for 3 h. IL-8 in the culture supernatants was determined by ELISA. Values represent the mean \pm SEM; $n = 5$ independent experiments. C) These siRNA-treated cells were incubated with Cy-3-labeled alpha-toxin (1.0 μ g/ml) at 37°C for 15 min. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with hoechst33342 and analyzed using fluorescence microscopy. The fluorescent intensity in the visual fields was measured. The binding of alpha-toxin to the intact cells was set as the maximal response (100%), against which all other results were compared. Values represent the mean \pm SEM; $n = 3$ independent experiments.

Fig. 10. Localization of alpha-toxin and TrkA in A549 cells.



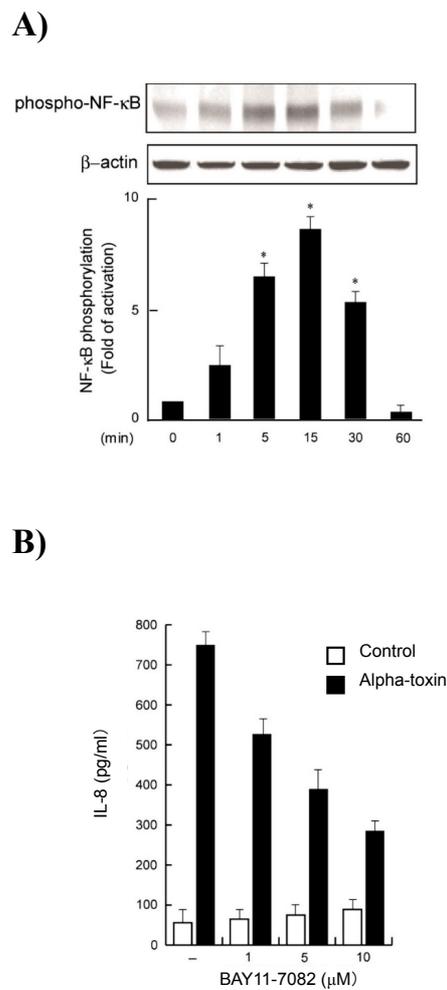
A549 cells were incubated with or without Cy3-coupled alpha-toxin (1.0 $\mu\text{g/ml}$) and Alexa488-conjugated anti-TrkA antibody at 37°C for 1 h. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with hoechst 33342. Alpha-toxin, TrkA, and nuclear staining were analyzed using confocal laser microscopy. A white arrow indicates the colocalization of alpha-toxin and TrkA. The data represents the mean for three independent experiments. Scale bar: 10 μm B) The percentage of colocalization was calculated for each combination of fluorescence markers by analysis of each confocal plane of > 20 cells.

Fig. 11. Phosphorylation of various kinase of MAPK cascades induced by alpha-toxin in A549 cells.



A) A549 cells (1.0×10^7 /ml) were incubated with alpha-toxin ($1.0 \mu\text{g/ml}$) at 37°C for various periods. The lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibodies against phosphorylated ERK1/2, phosphorylated p38 MAPK, phosphorylated SAPK/JNK, and β -actin. The data represents the mean for three independent experiments. B, C) A549 cells (1.0×10^7 /ml) were preincubated with (white circles) 10 nM K252a or without (black circles) the blocker at 37°C for 60 min, and then washed. The cells were incubated with $1.0 \mu\text{g/ml}$ alpha-toxin at 37°C for indicated periods. The phospho-ERK1/2 (B) and -p38 MAPK (C) extracted by 10% trichloroacetic acid was subjected to SDS-PAGE and immunoblotting using specific antibody. The phosphorylated level of ERK1/2 and p38 MAPK in untreated cells was set to 1. Values represent the mean \pm SEM; $n = 5$ independent experiments. D, E) A549 cells (1.0×10^7 /ml) were preincubated with various concentrations of PD98059 or SB203580 at 37°C for 60 min, and then washed. The treated cells were incubated with $1.0 \mu\text{g/ml}$ alpha-toxin at 37°C for 5 h. The level of IL-8 (empty columns) and phosphorylation (black circles) of various kinases was determined. The phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK induced by alpha-toxin was set as the maximal response (100%), against which all other results were compared. Values represent the mean \pm SEM; $n = 3$ independent experiments.

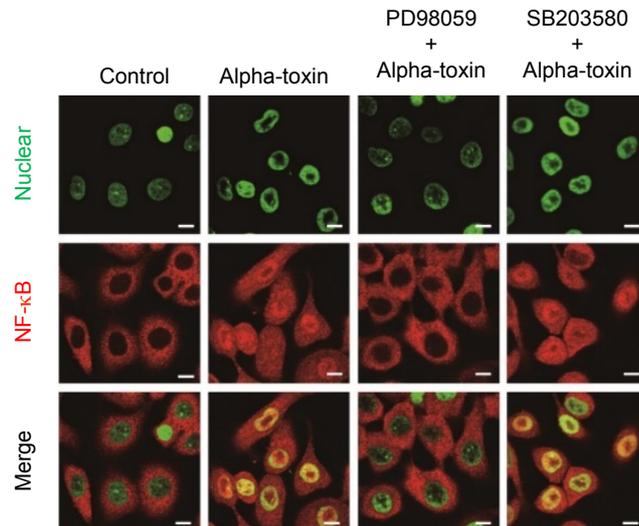
Fig. 12. Relationship between activation of NF- κ B and release of IL-8 induced by alpha-toxin.



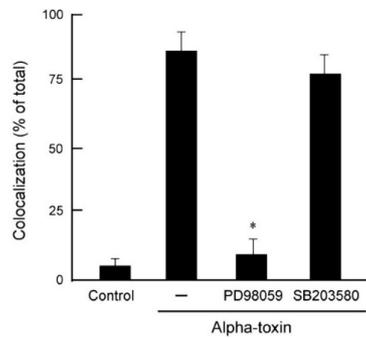
A) A549 cells (1×10^7 /ml) were incubated with alpha-toxin (1.0 μ g/ml) at 37°C for various periods. The lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibodies against phosphorylated NF- κ B, and β -actin. Signal intensities from immunoblots were recorded densitometrically. For quantification, NF- κ B signals applying the phosphorylation-sensitive antibody were normalized to the NF- κ B signals applying the antibody of NF- κ B. The phosphorylation level of untreated cells was set to 1. Values represent the mean \pm SEM; $n = 3$; * $P < 0.005$, compared with the phosphorylation of NF- κ B in untreated cells. B) The cells were pretreated with various concentrations of BAY11-7082 at 37°C for 1 h, and then incubated with (black columns) 1.0 μ g/ml alpha-toxin or without (white columns) the toxin at 37°C for 3 h.

Fig. 13. Effect of MAPK inhibitors on nuclear translocation of NF- κ B induced by alpha-toxin.

A)



B)

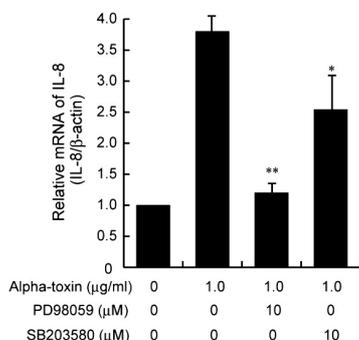


PD98059: ERK1/2 inhibitor
SB203580: p38MAPK inhibitor

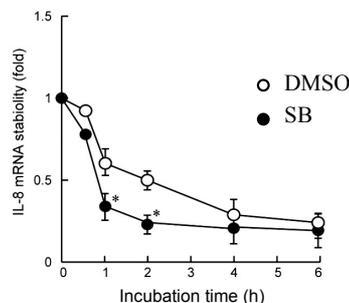
A) The cells were pretreated with 10 μ M PD98059 or 10 μ M SB203580 at 37°C for 60 min, and then incubated with alpha-toxin (1.0 μ g/ml) at 37°C for 15 min. The cells were fixed by paraformaldehyde and stained with SYTO 16 and antibody against NF- κ B. The nucleus and NF- κ B were viewed with confocal microscopy. The data represents the mean for three independent experiments. Scale bar: 10 μ m. B) The percentage of colocalization was calculated for each combination of fluorescence markers by analysis of each confocal plane of > 50 cells. Values represent the mean \pm SEM; $n = 3$; * $P < 0.003$, compared with the colocalization of NF- κ B with nuclei in untreated cells.

Fig. 14. Effect of MAPK inhibitors on expression of IL-8 induced by alpha-toxin in A549 cells.

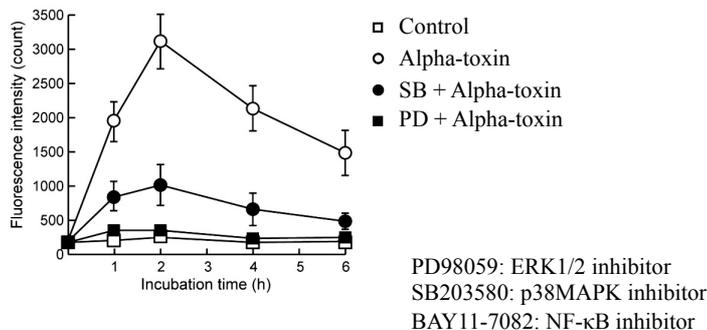
A)



B)

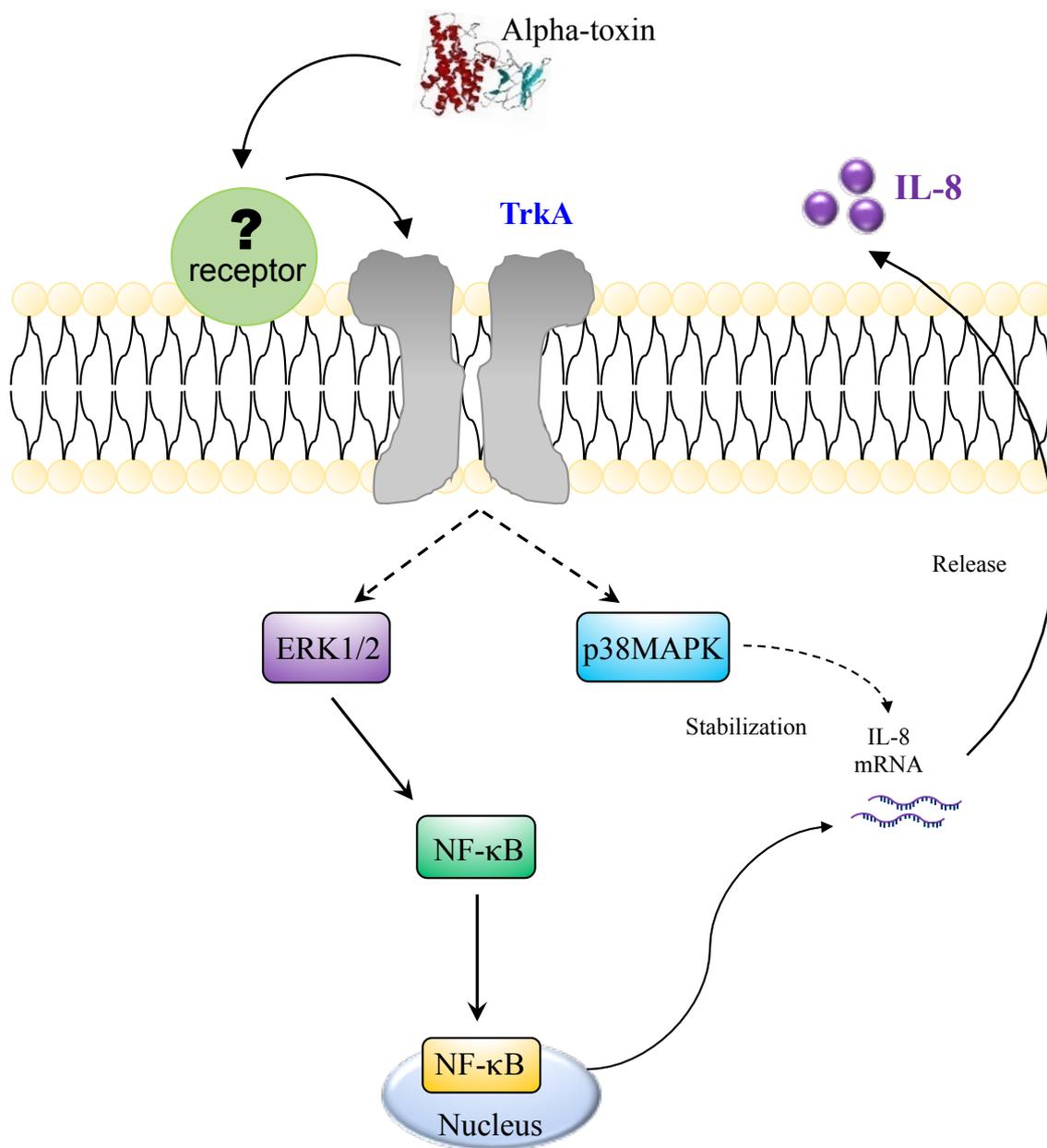


C)



A) A549 cells (1.0×10^7 /ml) were pretreated with 10 μM PD98059 or 10 μM SB203580 at 37°C for 1 h, and then incubated with alpha-toxin (1.0 μg/ml) at 37°C for 2 h. IL-8 mRNA expression was determined by RT-PCR. IL-8 mRNA was normalized with mRNA levels of the housekeeping gene β-actin. Signal densities from RT-PCR were recorded densitometrically. The IL-8 mRNA level of untreated cells was set to 1. Values represent the mean ± SEM; $n = 6$; * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$, compared with the expression of IL-8 mRNA in control cells treated with alpha-toxin. B) A549 cells (1.0×10^7 /ml) were treated with alpha-toxin for 2 h to allow transcription of mRNA. Cells were then treated with actinomycin D (5 μg/ml), and DMSO (white circles) or SB203580 (black circles). At indicated times, total RNA was isolated, reverse transcribed and analyzed by RT-PCR. Values were calculated as the fold-increase in total IL-8 mRNA, compared to the total amount of IL-8 mRNA before the addition of actinomycin D. Values represent the mean ± SEM; $n = 5$; * $P < 0.01$, compared with the expression of IL-8 mRNA in control cells treated with alpha-toxin. C) A549 cells (1.0×10^7 /ml) were pretreated with 10 μM SB203580 or 10 μM PD98059 at 37°C for 1 h, and then incubated with alpha-toxin (1.0 μg/ml) at 37°C for various periods. The cells were fixed by paraformaldehyde and stained with antibody against IL-8. IL-8 was viewed with fluorescence microscopy. The fluorescent intensity in the visual fields was measured. Symbols: control, white squares; alpha-toxin, white circles; PD98059 plus alpha-toxin, black squares; SB203580 plus alpha-toxin, black circles. Values represent the mean ± SEM; $n = 3$ independent experiments.

Fig. 15. Mechanism of release of IL-8 induced by alpha-toxin in A549 cells.



第二章 α 毒素受容体の同定

近年、世界で多数の研究グループが細菌毒素の特異的受容体の探索を行っており、数多くの毒素結合受容体が同定されている。その中で、クロストリジウム属の細菌が産生する毒素では、ボツリヌス菌 A 型神経毒素(69)やディフィシル菌 A 毒素(70)などの特異的な毒素結合受容体が報告されている。細菌の毒素受容体の同定は、感染症の新規な治療法の開発や特異的なリガンドとしての生物学的なツールとなり、様々な方面に有効な応用が期待できる。前章では、 α 毒素の受容体の一つとして、TrkA の可能性が示された。一方、TrkA に対する特異的なリガンドとして知られる神経成長因子(NGF)を用いた検討では、NGF は α 毒素の結合を阻害せず、さらに、NGF 単独処理では A549 細胞からの IL-8 の遊離は認められなかった(データは示していない)。すなわち、NGF は TrkA に結合して作用するが、A549 細胞では、 α 毒素の結合阻害や IL-8 遊離を抑制しなかったため、 α 毒素は TrkA 以外にも作用していると考えた。つまり、本毒素は TrkA に直接結合するのではなく、それ以外の細胞膜表面の分子を認識して結合後、TrkA に作用していると推察した。これまでに、破傷風神経毒素(71)やボツリヌス神経毒素(72)は、受容体としてタンパク質性の分子ではなく、スフィンゴ糖脂質、いわゆる、ガングリオシドを特異的に認識して結合すると報告されている。ガングリオシドは、細胞膜表面に存在し、脂質部分を構成するセラミドと糖部分の N-アセチルガラクトサミンやシアル酸などで構成されており、その糖部分が糖鎖を形成し、物質の結合や細胞間シグナル情報伝達など様々な役割を担っていることが知られている。一方、 α 毒素分子中には、ボツリヌス神経毒素に存在するガングリオシド結合モチーフと共通の配列が認められ、本毒素もガングリオシドに結合する可能性があると考えた。そこで本章では、 α 毒素の結合受容体を同定するために、ガングリオシドに着目し、解析を行った。

第一節 α 毒素の作用とガングリオシドの関係

現在、ガングリオシドは約 40 種類が同定されており、それぞれの機能や役割について、作用が明らかになった場合もあるが、未だ不明な点が多い(73-75)。本節では、まず α 毒素の IL-8 遊離に対するガングリオシドの役割を検討した。次に、個々のガングリオシドを用いて α 毒素との結合解析を行うのは非常に困難であるため、 α 毒素とガングリオシドとの結合について、種々のガングリオシドを固定化した糖脂質アレイにより網羅的な解析を行った。

【実験材料及び実験方法】

1) α 毒素による IL-8 の遊離及び毒素の結合に対するガングリオシドの役割

A) ガングリオシド生合成の阻害

<実験材料>

ガングリオシド生合成阻害剤: PPMP

(*L*-erythro-2-tetradecanoylamino-1-phenyl-1-propanol) [Matreya LLC, 1860, MW 361]を 1.0 mg 量り、99% ethanol 277 μ l で溶解し、10 mM として調製した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。A549 細胞をあらかじめ PPMP (1, 5, 10 μ M) で 4 日間処理した。以降の実験方法は、第一章第二節-3 に従った。

B) ガングリオシド糖鎖の分解

<実験材料>

ノイラミニダーゼ: Neuraminidase from *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) TypeV [Sigma, N2876]を 1.3 mg (7.8 units/mg)を生理食塩水 500 μ l で溶解し、20 U/ml として調製した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。A549 細胞をあらかじめノイラミニダーゼ(10, 50, 100 U/ml)で 37°C、1 時間処理した。以降の実験方法は、第一章第二節-3 に従った。

2) 糖脂質糖鎖固定化アレイを用いた網羅的解析

<実験材料>

糖脂質糖鎖固定化アレイ: [住友ベークライト, BS-X1715] 固定化糖鎖濃度: 0.25 mM

GM3, GD3, GT3, GM2, GD2, GT2, GM1a, GM1b, GD1a, GD1b, GT1a, GT1c, GA1, Fucosyl-GM1, GA2, Gb3, Gb4, Gb5, Globo-H, Globo-A, Globo-B, SSEA-4-tetraose, SSEA-4-hexaose, Forssman antigen の合計 24 種類をプレートに固定化している。

反応用 buffer の調製: 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、500 mM NaCl、1 mM CaCl₂、5 mM MgCl₂、0.05% Tween20、そして、BSA を 0.1 g 加え、超純水で 10 ml にメスアップした。

洗浄用 buffer の調製: 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、500 mM NaCl、1 mM CaCl₂、5 mM MgCl₂、そして、0.5% Tween20 を加え、超純水で 100 ml にメスアップした。

<実験方法>

Cy3 ラベル α 毒素を反応用 buffer で 100 µg/ml となるように希釈し、糖脂質糖鎖固定化プレート上に 70 µl 添加した。ハイブリカバーを被せて、蒸留水で湿らせたキムワイプを入れて 37°C で 15 分間インキュベーションした。その後、超純水中でハイブリカバーを外し、洗浄用 buffer を入れたハイブリコンテナー内にプレートを入れ、1 分間緩やかに攪拌し、超純水で満たしたアルミを巻き遮光した 50 ml 遠沈管に、プレートを移した。その後、超音波[BIORUPTOR]を 30 秒間あて、非特異的に結合した毒素を除去した。乾燥させたプレートは、Affymetrix 428TM array scanner で蛍光を検出した。

3) α 毒素の GM1a に対する結合の確認

<実験材料>

BODIPY-GM1a: BODIPY[®]FLC₅-ganglioside GM1a [Invitrogen, B13950] 25 µg を 99% Methanol 105.4 µl で溶解し、150 µM に調製した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。ガラスボトムディッシュに播種した A549 細胞の培地を除去し、あらかじめ氷冷した Hoechst33342 入り FBS/DMEM 培地を 200 µl 添加し、4°C で 15 分間インキュベーションした。培地を除去し、あらかじめ氷冷した終濃度 150 nM の BODIPY-GM1a 入り FBS/DMEM 培地を 200 µl 添加し、4°C で 45 分間インキュベーションした。その後、氷冷した FBS/DMEM 培地で 2 回洗浄し、 α 毒素入り FBS/DMEM 培地を 200 µl 添加した。以降、共焦点レーザー顕微鏡についての実験方法は、第一章第二節-5-B に従った。

【実験成績】

α 毒素とガングリオシドの関係を明らかにするため、まず、本毒素による IL-8 の遊離に、ガングリオシドが関与するかどうかを検討した。ガングリオシドは、セラミドからグルコシルセラミドが生合成され、その後、各ガングリオシドとして生合成される。そこで、本毒素がガングリオシドを介して IL-8 遊離を促進するかどうかを明らかにするため、内因性グルコシルセラミド合成酵素阻害剤 (PPMP) で、A549 細胞を 4 日間処理してガングリオシドの生合成が阻害された細胞を作製した。次に、ガングリオシドの糖鎖、特に、シアル酸を特異的に認識して切断する酵素であるノイラミナーゼで A549 細胞を処理し、細胞膜表面に存在するガングリオシドの糖鎖部分が切断された細胞を作製した。PPMP、または、ノイラミナーゼで処理した A549 細胞では、ガングリオシド GM1 に特異的に結合する Cholera toxin B subunit (CTB) の蛍光ラベル体を添加し、蛍光顕微鏡で観察すると、未処理細胞の場合と比較して、CTB の結合が著しく低下した (データは示していない)。すなわち、いずれの処理においても細胞膜上でのガングリオシドの発現が低下していることが判明した。そこで、PPMP、または、ノイラミナーゼで処理した A549 細胞に、 α 毒素を添加し、IL-8 の遊離を測定した。その結果、いずれの場合も処理濃度に依存して、本毒素による IL-8 の遊離が低下した (Fig. 16A)。さらに、PPMP、または、ノイラミナーゼを処理した細胞に対する Cy3 ラベル α 毒素の結合を観察したところ、先程と同様に、試薬の処理濃度依存的に、本毒素の結合が阻害された (Fig. 16B)。以上から、本毒素はガングリオシド、特に、糖鎖部分を特異的に認識して、IL-8 の遊離を引き起こしている可能性が考えられる。

次に、 α 毒素が認識するガングリオシドを特定するため、24 種類の糖脂質糖鎖を固定化したアレイを用いて、網羅的な解析を行った。まず、糖脂質糖鎖が固定化されたプレートに、Cy3 ラベル α 毒素を添加し、37°C で 15 分間インキュベーションし、洗浄後、Cy3 の蛍光をアレイスキャナーで解析した。その結果、Fig. 17A に示すように、GM1a 糖鎖にのみ Cy3 ラベル α 毒素が結合した強いシグナルが観察された。Fig. 17B に示すように、ガングリオシド GM1a の構造と他のガングリオシドの構造を比較すると、末端

が Galactose-N-acetylgalactosamine-Galactose の配列で、シアル酸が 3 位の糖に結合した構造が α 毒素による認識に重要であると考えられる。Puri ら(76)は、内在性スフィンゴ糖脂質のメンブレントラフィックのモデルとして、BODIPY で蛍光ラベルしたスフィンゴ糖脂質(GM1 や GD2 など)を細胞に取り込ませ、スフィンゴ糖脂質の細胞膜上での挙動や細胞内輸送を観察し、細胞膜上の内在性スフィンゴ糖脂質は細胞内へ取り込まれてリソソームへと輸送されることを報告している。また、BODIPY で蛍光ラベルした GM1a(BODIPY-GM1a)を取り込ませた細胞では、細胞膜上で BODIPY-GM1a と内在性 GM1a は共局在し、両者は細胞膜上で CTB と結合すると報告されている(77)。そこで、本毒素と GM1a との関係について、詳しく解析するために、BODIPY-GM1a を A549 細胞に取り込ませ、GM1a を細胞膜上に擬似的に発現させた。この細胞に Cy3 ラベル α 毒素を添加し、毒素と GM1a の局在について共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、本毒素と GM1a は、細胞膜上に局在し、さらに両者の共局在が観察され、その共局在率は約 70%であった (Fig. 18)。さらに興味深い事に、 α 毒素を添加していない細胞では、GM1a は細胞膜上で均一に存在していたが、本毒素を処理した細胞では、細胞膜上で GM1a の集積、すなわち、GM1a のクラスター形成が認められた。Kakio ら(78)は、細胞膜の脂質組成(特に、コレステロールや SM など)の変化が、細胞膜上での GM1a のクラスター形成を促進すると報告している。すなわち、 α 毒素が GM1a に結合後、毒素自身の PLC 活性により細胞膜上の脂質組成を変化させ、GM1a のクラスター形成を誘導すると考えられる。

以上より、 α 毒素は細胞膜上のガングリオシド GM1a を特異的に認識して結合し、毒素自身の PLC 活性が GM1a のクラスター化を誘導し、IL-8 の遊離を惹起することが判明した。

第二節 ガングリオシド欠損マウスを用いた α 毒素の作用解析

前節より、 α 毒素は、ガングリオシド GM1a に特異的に結合することが明らかとなった。生体内で GM1a はユビキタスに発現しており、その作用は細胞の分化や機能維持など多数の役割を担っている(73-75)。そこで、本毒素による生体内での作用とガングリオシドとの関係を詳しく解析するために、ガングリオシド欠損マウスを用いて検討した。

【実験材料及び実験方法】

1) ガングリオシド欠損マウスに対する α 毒素の致死活性

A) ノックアウトマウスの致死

<実験材料>

野生型マウス: C57BL/6 [日本 SLC, 雄, 20 週齢]

β -1,4-GalNAc-Transferase (GalNAcT^{-/-}) 欠損マウス: 名古屋大学医学部 古川鋼一先生より供与 [雄, 20 週齢]

α 2,8-sialyltransferase (ST^{-/-}) 欠損マウス: 名古屋大学医学部 古川鋼一先生より供与 [雄, 20 週齢]

<実験方法>

週齢、性別(雄)、及び、体重を揃えたそれぞれのマウスを 1 群 3 匹ずつ準備した。GTBS で 200 ng/mouse となるように希釈した α 毒素を各マウスに 100 μ l ずつ腹腔内投与した。毒素投与後、マウスの生存を注意深く観察し、生存時間を測定した。

B) ノックアウトマウス由来腹腔マクロファージに対する α 毒素の作用

<実験材料>

5% チオグリコール酸培地の調製: 100°C の乾燥機で 1 週間酸化させたチオグリコール酸培地 5 g を蒸留水 100 ml で溶解し、10 ml のネジ付き試験管に分注し、使用す

るまで 4°C で保存した。

0.05% EDTA-PBS 溶液の調製: EDTA [Nacalai tesque, 151-30]を PBS 100 ml で溶解し、0.2 μm フィルターシリンジでろ過滅菌した。

<実験方法>

週齢、性別(雄)、及び、体重を揃えたそれぞれのマウスを 1 匹ずつ準備した。各マウスに 300 μl の 5% チオグリコール酸培地を腹腔内投与した。4 日後、0.05% EDTA-PBS 溶液を用いて腹腔内液をマイクロピペッターを用いて 15 ml 遠沈管に回収した。その後、4°C、1,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。細胞を 10% FBS-1%-pen-strep-DMEM 培地で、2 回洗浄後、細胞数をカウントした。次に、ガラスボトムディッシュに、それぞれ、 5×10^6 個ずつ播種し、24 時間、37 °C、5 % CO₂ の条件下でインキュベーションした。その後、10% FBS-1%-pen-strep-DMEM 培地で、2 回洗浄後、10% FBS-1%-pen-strep-DMEM 培地を加えて、さらに 24 時間 37 °C、5 % CO₂ の条件下でインキュベーションし、細胞を安定化させた。α 毒素による細胞からの GRO/KC の遊離は、第一章第一節 3 に従って検討した。α 毒素の結合について、第一章第二節 5-B に従って実験を行った。

【実験成績】

生体内で α 毒素がガングリオシドを認識して作用するかどうかは不明である。そこで、2 種類のガングリオシド欠損マウスを使用して、本毒素の致死効果を検討した(79-82) (Fig. 19A)。GalNAcT^{-/-}マウスは GM1a を含む複数のガングリオシドの合成能を有していない。一方、ST^{-/-}マウスは GM1a の合成能を有するが、それ以外の複数のガングリオシド合成能が欠損している。すなわち、GalNAcT^{-/-}マウスは GM1a 欠損モデルで、ST^{-/-}マウスは GM1a が存在するコントロールマウスとして使用されている。これらのマウスを用いて、まず、 α 毒素による致死活性に GM1a が関与するかどうかを検討した。Fig. 19B に示すように、本毒素を腹腔内投与した時、野生型 C57BL/6 マウス、及び、ST^{-/-}マウスは、毒素投与後、約 7 時間で死亡した。これに対し、GalNAcT^{-/-}マウスは、約 35 時間後に死亡し、約 5 倍の致死時間の延長が観察された。すなわち、GM1a が欠損した GalNAcT^{-/-}マウスでは、本毒素の毒性が減弱することが判明した。一方、GalNAcT^{-/-}マウスは α 毒素による致死を完全に阻害しなかったことから、本毒素は GM1a 以外の分子も受容体として認識している可能性が示唆された。

次に、 α 毒素の作用における GM1a の役割を詳細に解析するために、各ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージを用いて、 α 毒素による GRO/KC の遊離を測定した。その結果、Fig. 19C に示すように、野生型、及び、ST^{-/-}由来腹腔マクロファージでは、毒素の処理時間に依存して GRO/KC の遊離が認められた。これに対し、GalNAcT^{-/-}由来腹腔マクロファージでは、前者と比較して本毒素による GRO/KC の遊離が有意に減少した。そこで、GM1a が α 毒素の結合に関与するかどうかを検討するため、Cy3 ラベル α 毒素をそれぞれの腹腔マクロファージに添加し、その結合を観察した。Fig. 19D に示すように、野生型、及び、ST^{-/-}由来腹腔マクロファージでは、本毒素の細胞表面への結合が観察された。一方、GalNAcT^{-/-}由来腹腔マクロファージでは、 α 毒素の結合が有意に低下していた (Fig. 19D, E)。以上より、本毒素による *in vivo* での毒性発現に、GM1a が非常に重要な役割を演じていることが判明した。

第三節 α 毒素分子中の GM1a との結合領域

前節までの結果より、 α 毒素はガングリオシド GM1a に特異的に結合して作用することが判明している。Tsukamoto ら(83)は、ボツリヌス神経毒素のガングリオシド結合モチーフを明らかにしている。一方、そのアミノ酸モチーフは、 α 毒素の分子内でも共通する配列が認められた。そこで、本毒素のガングリオシド認識領域の探索を行った。

【実験材料及び実験方法】

1) α 毒素変異体(D81A、N82A、S83A、W84A、Y85A、Y88A)の遺伝子構築

<実験材料>

LA PCR *in vitro* mutagenesis Kit: [TAKARA, RR016]

TaKaRa Ex Taq™ kit: [TAKARA, RR001A]

アンピシリン-LB 培地: Bacto™ Tryptone [Difco, 211705] 10.0 g、Bacto™ Yeast Extract [Difco, 212750] 5.0 g、及び、塩化ナトリウム (NaCl) [Nacalai tesque, 31320-76, M.W. 58.44] 10.0 g、寒天末[Nacalai tesque, 01028-85]15.0 g を蒸留水に溶解し、1 N NaOH で pH 7.2 に調整し、蒸留水で全量を 1,000 ml にした後、オートクレーブで、121°C、20 分間、高圧蒸気滅菌した。その後、70°C 程度まで冷やし、5.0 mg/ml Ampicillin sodium salt [Nacalai tesque, 02739-32, MW 371.39]を終濃度 100 μ g/ml となるように添加した。その後、固まらないように注意しながら、約 20 ml ずつ滅菌シャーレに流し込み、しばらく乾燥させた後、4°C で保存した。

Competent cell (*E. coli*): Competent high DH5 α [TOYOBO, DNA-903]、Competent high JM109 [TOYOBO, DNA-900]のどちらかを使用。いずれも、Heat shock 用であり、エレクトロポレーションには向かない。

X-gal の調製: X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) [Sigma, B4252] 40 mg を N, N-ジメチルホルムアミド 2.0 ml で溶解し、使用した。-20°C で保存

した。

IPTG の調製: IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) [Nacalai tesque, 19742-94] 2.0 gを蒸留水 8.0 mlで溶解し、ろ過滅菌して使用した。-20°Cで保存した。

Primer

α 毒素遺伝子の配列

81 82 83 84 85 88
5'-AAG GAT AAT AGT TGG TAT TTA GCT TAT TCT-3'
D N S W Y Y

D81A	5'-AATTTCTCAAAGGCCAATAGTTGGTAT-3'
N82A	5'-TTCTCAAAGGATGCCAGTTGGTATTTA-3'
S83A	5'-TCAAAGGATAATGCCTGGTATTTAGCT-3'
W84A	5'-AAGGATAATAGTGCCTATTTAGCTTAT-3'
Y85A	5'-GATAATAGTTGGGCCCTTAGCTTATTCT-3'
Y88A	5'-TGGTATTTAGCTGCCTCTATACCTGAC-3'

*GCC→アラニン

SH01 配列確認用

AT-ID 001 For	5'-GCGCTTATTTGTGCCGCG-3'
AT-ID 002 Rev	5'-CGCGGCACAAATAAGCGC-3'
AT-ID 003 For	5'-TGGGATTATGCAGCAAAG-3'
AT-ID 004 Rev	5'-CTTTGCTGCATAATCCCA-3'
AT-ID 005 For	5'-CCTGACACAGGGGAATCA-3'
AT-ID 006 Rev	5'-TGATTCCCCTGTGTCAGG-3'

pHY300PLK (vector 側) 配列確認用

pHY001	5'-AGCGTCAGATTTTCGTGATGCTTG-3'
pHY002	5'-ATCGTTAAGGGATCAACTTTGG-3'

<実験方法>

LA PCR in vitro mutagenesis kit による部位特異的置換法

D81A の変異断片は、TaKaRa Ex Taq kit を用いて作製した。シグナルシーケンス領域 (84 bp) を持つ SH01 遺伝子 (1,110 bp) を pUC19 vector に挿入したものを pU13R とした。pU13R を鋳型として、M13Rev primer と Mutagenic primer を用いて SH01 遺伝子内の変異させる塩基から 3' 末端までを下記に示す ReactionA、そして、MUT3 primer と M13 For primer を用いて、SH01 遺伝子の全てと pU13R の *Hind* III 切断部位の消失した DNA フラグメント (Reaction B) を Ex Taq PCR (98 °C で 10 秒、55 °C で 30 秒、72 °C で 1 秒/1 cycle) により増幅した (1st PCR)。

Reaction A

PU13R (1.0 ng/μl)	5.0 μl
D81A (× 10)	1.0 μl
M13 Rev primer (× 10)	1.0 μl
10× Ex Taq PCR buffer (+Mg ²⁺)	5.0 μl
dNTP mixture (2.5 mM each)	8.0 μl
TaKaRa Ex Taq (5.0 units/μl)	0.5 μl
RNase free DW	29.5 μl
Total	50 μl

Reaction B

PU13R (1.0 ng/μl)	5.0 μl
MUT3 primer (× 10)	1.0 μl
M13 For primer (× 10)	1.0 μl

10× Ex Taq PCR buffer (+Mg ²⁺)	5.0 μl
dNTP mixture (2.5 mM each)	8.0 μl
TaKaRa Ex Taq (5.0 units/μl)	0.5 μl
RNase free DW	29.5 μl
<hr/>	
Total	50 μl

1st PCR 後に、各反応液に RNase free DW を加えて全量 300 μl とし、過剰なプライマー、及び、dNTP を除去するため Suprec™-01[TaKaRa, 9040]に移し、3,000 rpm でカラム内が約 50 μl になるまで遠心した(この間、遠心を止めて液量が 50 μl 以下にならないように確認する)。カラムに通した 1st PCR 反応液 3.0 μl をアガロースゲル電気泳動にアプライし、目的のバンドを確認後、濃度決定を行った。次に、Reaction A の DNA フラグメントと Reaction B の DNA フラグメントを 1:1 で混合し、以下に示す反応系にて 94 °C で 10 分間加熱後、60 分間かけて 37 °C まで冷却し、37 °C で 15 分間保持した。

<u>Hetero duplex の作製</u>	
D81A-Reaction A	1.0 μl
Reaction B	1.0 μl
10× Ex Taq PCR buffer (+Mg ²⁺)	5.0 μl
dNTP mixture (2.5 mM each)	8.0 μl
RNase free DW	35 μl
<hr/>	
Total	50 μl

上記の反応液に TaKaRa Ex Taq 1.0 μl を加えてタッピングし、軽く遠心後、72°C で 3 分間インキュベーションすることにより完全なヘテロ DNA 二重鎖を作製した。次に、M13RV primer、及び、M13 For primer を加えて、全 SH01 遺伝子を増幅した。その方法、以下に示し、PCR (98 °C で 30 秒、55 °C で 2 秒、72 °C で 10 秒/1 cycle を 10 cycles) により増幅した (2nd PCR)。

Hetero 二本鎖	48 μ l
M13 RV primer (1.0 pmol/ μ l)	1.0 μ l
M13 For primer (1.0 pmol/ μ l)	1.0 μ l
Total	50 μ l

反応終了後、反応液の一部を取り(3.0 μ l)、アガロースゲル電気泳動で目的のバンドを確認し、エタノール沈殿を行い、最終的に、10 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。次に、この DNA フラグメントを DNA Ligation kit ver.1 [TaKaRa, 6021]を用いて、下記の条件の通りに抽出した DNA フラグメントを pT7Blue vector に Ligation し、大腸菌 JM109 に、Heat shock 法でトランスフォームし、X-gal 培地に接種し、白色コロニーのミニプレップを行った。

Ligation	
pT7 Blue vector	2.0 μ l
Plasmid-D81A	2.0 μ l
Solution A	16 μ l
Solution B	4.0 μ l
Total	24 μ l

Heat shock

Competent Cell 100 μ l を氷上にて溶解し、Self-ligation 反応液を 10 μ l 加えて軽くタッピングし、氷上にて 30 分間インキュベーションし、その後、42 °C、1~1.5 分間 Heat Shock し、氷中で 3 分間インキュベーションした。室温 SOC 培地を 900 μ l 加えて軽くタッピングし、37 °C、1 時間以上振とうせずにインキュベーションした。その後、アンピシリン含有 LB 培地 (X-gal、IPTG 塗抹) に、50、100、200 μ l ずつ播き、全体に軽く伸ばし、37 °C で O/N インキュベーションした。得られた白色コロニーは、PureYield™ Plasmid Miniprep system [Promega, A1222]を用いて少量調製を行い、その後、アガロースゲル電気泳動より pT7 Blue-D81A のバンドの確認を行った。

pT7 Blue-D81A の配列確認

pT7 Blue-D81A の配列について、SH01 確認用 primer (AT-ID 001)を用いて、下記

に示す組成で、PCR (96 °C で 10 分/1 cycle、96 °C で 10 秒、50 °C で 5 秒、60 °C で 4 分/1 cycle を 25 cycles) により増幅した。

pT7 Blue-D81A (10 ng/μl)	1.0 μl
New Big Dye V1.1	2.0 μl
Big Dye ×5 buffer X-Terminator	2.0 μl
AT-ID 001 (10 pmol/μl)	1.0 μl
RNase free DW	4.0 μl
Total	10 μl

その後、BigDye® X Terminator™ Purification kit [Applied Biosystems, 4376486]を用いて、滅菌 1.5 ml マイクロチューブに、PCR 産物 10 μl、SAM 溶液 45 μl と X-Terminator 溶液 10 μl を加えて、30 分間攪拌した後、1000 xg で 2 分間遠心した。遠心後の上清 20 μl を MicroAmp™ Optical 96 well reaction plate の 1 レーン分に移し、付属のゴム蓋をセットした。この際、8 well 分の Sample が無い場合、20 μl の Hi-DiFormamide [Applied Biosystems]を加えた。その後、ジェネティックアナライザー ABI3500 を使用してシーケンス解析を行った。

次に、配列が確認できた pT7 Blue-D81A を制限酵素 *EcoR I*、*HindIII*、B buffer [Roche]を用いて、37 °C、12 時間インキュベーションした。pHY300PLK vector の *EcoR I*/*HindIII* サイトも同様に制限酵素カット処理した。

pT7 Blue-D81A (400 ng/μl)	10 μl	pHY300PLK (400 ng/μl)	10 μl
<i>EcoR I</i>	3.0 μl	<i>EcoR I</i>	3.0 μl
<i>HindIII</i>	3.0 μl	<i>HindIII</i>	3.0 μl
Roche-B buffer	6.0 μl	Roche-B buffer	6.0 μl
RNase free DW	38 μl	RNase free DW	38 μl
Total	60 μl	Total	60 μl

反応終了後、アガロースゲル電気泳動で目的のバンドを確認し、バンドの切り出し

を行った。

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit [Macherey-Nagel, U0609B]

分離した目的のバンドをカッターで切り出し、滅菌 1.5 ml チューブに入れ、ゲルの重さを測定した。ゲル 100 mg に対し、200 µl の NT1 を添加し、50°C で約 5 分間インキュベーションし、ゲルを溶解させた。Gel and PCR Clean-up column を Collection tube にセットし、ゲル溶液をカラムに添加し、11,000 xg で 30 秒間遠心した。フロースルーを捨て、700 µl の NT3 を添加し、11,000 xg で 30 秒間遠心する作業を 2 回繰り返した。その後、フロースルーを捨て、さらに、11,000 xg で 1 分間遠心した。カラムを新しい滅菌 1.5 ml チューブにセットし、20 µl の NE を添加し、室温で 1 分間インキュベーション後、11,000 xg で 1 分間遠心し、目的遺伝子を抽出した。得られた Sample は、NanoDrop1000 分光光度計で濃度を決定した。

制限酵素カット後の D81A、及び、pHY300PLK を 16°C で O/N 処理し、Ligation 産物を大腸菌 JM109 に、Heat shock 法でトランスフォームして X-gal 培地に接種し、白色コロニーのミニプレップを行った。

<u>Ligation</u>	
D81A (<i>EcoR I</i> / <i>HindIII</i> cut)	2.0 µl
pHY300PLK (<i>EcoR I</i> / <i>HindIII</i> cut)	2.0 µl
Solution A	16 µl
Solution B	4.0 µl
Total	24 µl

得られたコロニーの miniprep を行い、アガロースゲル電気泳動により、pHY300PLK-D81A のバンドを確認した。その後、SH01 確認用 primer (AT-ID 001 For、AT-ID 002 Rev、AT-ID 003 For、AT-ID 004 Rev、AT-ID 005 For、AT-ID 006 Rev)、及び、pHY300PLK (vector 側) 確認用 primer (pHY-001、pHY-002) を用いて確認した。目的とする SH01 部位特異的変異、及び、vector への挿入を確認後、得られた Plasmid を枯草菌にトランスフォームし、第一章第一節-1 に従い毒素変異体の精製を

行った。

- 2) α 毒素変異体 (D81A、N82A、S83A、W84A、Y85A、Y88A) による A549 細胞からの IL-8 遊離

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。以降の実験方法は、第一章第二節-2 に従った。

- 3) α 毒素変異体 (D81A、N82A、S83A、W84A、Y85A、Y88A) による A549 細胞への結合

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。以降の実験方法は、第一章第二節-5-B に従った。

- 4) α 毒素変異体 (D81A、N82A、S83A、W84A、Y85A、Y88A) による TrkA のリン酸化

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。以降の実験方法は、第一章第二節-3 に従った。

- 5) α 毒素変異体の GM1a リポソームへの結合性 (SPR 解析)

A) GM1a 含有リポソームの調製

<実験材料>

GM1a: Ganglioside GM1a, Ammonium Salt, Bovine Brain [Calbiochem, 345724] 1.0 mg を Methanol 400 μ l に溶解し、2.5 μ g/ μ l に調製した。-20 °C で保存。

Phosphatidylcholine (PC):18:1 (Δ 9-Cis) PC (DOPC) 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phos-

phocholine [Avanti Polar Lipids, 850375P] 1.0 mg を Methanol 400 μl に溶解し、2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調製した。-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存。

Sphingomyelin (SM): Sphingomyelin from Bovine Brain [Nacalai tesque, 32156-74] 1.0 mg を Methanol 400 μl に溶解し、2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調製した。-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存。

Cholesterol (Chol): [Nacalai tesque, 08721-75] 1.0 mg を Methanol 200 μl に溶解し、2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調製した。-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存。

HBS-N の調製: HEPES [Nacalai tesque, 17546-05] 1.19 g、及び、NaCl 4.38 g を蒸留水に溶解し、1 N NaOH で pH 7.4 に調整後、蒸留水で全量を 500 ml とした。

1.5 ml シリコナイズマイクロチューブ 丸底: [WATOSON, 131-615CH]

<実験方法>

GM1a 含有リポソームの調製

GM1a : PC : SM : Chol の混合比が 1 : 1 : 1 : 2 になるように、40 μl : 40 μl : 40 μl : 80 μl を中試験管に混合した。溶媒を N_2 ガスで留去しながら試験管の底 1 cm 程に全体的に広げた。さらに、クロロホルム 300 μl でもう一度溶解後、同様な操作で溶媒を留去した。その後、デシケーターで 30 分間乾燥させた。試験管の底の脂質に、HBS-N を Vortex しながら 100 μl 加え、さらに、30 秒間隔で 55 $^{\circ}\text{C}$ の温浴につけ、この操作を 3 回繰り返した。完成したリポソームをシリコン処理マイクロチューブに回収し、HBS-N を 0.5 ml 加えて共洗いした。回収後、15,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分間遠心し、上清を除去後、HBS-N を 1.0 ml 加えて洗浄した。この操作を 2 回繰り返し、上清を除去後、HBS-N を 200 μl 加え、超音波を 10 秒間処理し、GM1a リポソームとして使用した。

B) Biacore を用いた SPR 解析

<実験材料>

Sensor Chip L1: [Biacore, BR-1005-43] デキストランに疎水基を導入したタイプで、リポソームなどの脂質二重膜をキャプチャーする。

360 mM CaCl_2 溶液の調製: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Wako, 034-12772, MW 147.01] 5.29 g を蒸

留水 100 ml で溶解後、オートクレーブで、121°C、20 分間高圧蒸気滅菌したものを使用した。

Running Buffer (HBS-N + 1 mM CaCl₂)の調製: 360 mM CaCl₂ 1.0 ml を HBS-N 359 ml に溶解した。Ca²⁺ 不含 buffer では結合が安定しなかった。

50 mM NaOH の調製: NaOH [Nacalai tesque, 31511-05, MW 40.0] 200 mg を蒸留水 100 ml で溶解した。

20 mM CHAPS の調製: CHAPS [Sigma, C5070] 12.3 mg を Running Buffer 1.0 ml で溶解した。

BSA-PBS 溶液の調製: BSA 1.0 mg を PBS 10 ml で溶解し、0.1 mg/ml として使用した。

Amine coupling kit: [BIACORE, BR-1000-50]

Glycine: [BIACORE, BR-1003-54]

50 mM NaOH: [BIACORE, BR-1003-58]

BIA maintenance kit: [BIACORE, BR-1006-66]

< 実験方法 >

BIACORE 3000 Control Software を立ち上げ、測定に使用するセンサーチップ (L1) を挿入し、Running Buffer、廃液ボトルを確認後、Prime を行った。アナライトのインジェクト法として、流速を 5.0 µl/min に設定し、20 mM CHAPS を 25 µl、GM1a リポソーム溶液を 150 µl、NaOH 溶液を 5.0 µl、そして、BSA 溶液を 25 µl ずつ順番にインジェクトした。その後、Running buffer として、HBS-N containing 1 mM CaCl₂ をセットし、サンプルを Running buffer で溶解し (α 毒素 0、0.2、1.0、2.5、5.0 nM)、バイアルの位置、容量を確認後、測定を行った。

【実験成績】

Clarkら(84)は、 α 毒素のループ領域(72-93 残基)が細胞膜への結合に関与する可能性を報告した。また、Arimitsu と Walkerら(85, 86)は、ボツリヌス神経毒素のガングリオシド結合モチーフを明らかにしており、さらに、これらのモチーフは、 α 毒素とボツリヌス神経毒素、及び、破傷風神経毒素で高い相同性を示すことを明らかにした(87)。そこで、本毒素の分子内に、同様なガングリオシド結合モチーフが存在するかどうかを検討した。アミノ酸シーケンス解析結果をもとに、 α 毒素、ボツリヌス神経毒素、及び、破傷風毒素のアミノ酸配列を比較したところ、本毒素は他の毒素が有するガングリオシド結合モチーフ(H...SxWY...G)を有することが判明した。さらに、ガングリオシド結合モチーフは、 α 毒素の N-ドメインと C-ドメインの間に位置し、両者の配向に関するループ領域(72-93 残基)に存在することが明らかとなった(Fig. 20)。この配列の中で、ボツリヌス神経毒素や破傷風神経毒素では、ガングリオシド結合モチーフのトリプトファン(Trp)残基、及び、チロシン(Tyr)残基がガングリオシドとの結合に関与すると報告されている(85, 86)。そこで、 α 毒素のガングリオシド結合モチーフ内の Trp 残基、Tyr 残基、及び、その周辺アミノ酸残基に着目し、それぞれのアミノ酸をアラニンに置換した毒素の変異体を作製し、精製を行った。まず、これらの α 毒素変異体が IL-8 遊離作用を有するかどうかを検討した。Fig. 21A に示すように、A549 細胞を野生型 α 毒素、または、種々の毒素変異体で処理し、IL-8 の遊離を測定した。その結果、D81A、N82A、S83A、及び、Y88A では、野生型 α 毒素と同様に IL-8 遊離を引き起こした。一方、W84A と Y85A では、野生型 α 毒素と比較して、有意に IL-8 遊離が低下した。さらに、 α 毒素変異体の結合を検討するために、Cy3 ラベル野生型 α 毒素、または、Cy3 でラベル化した種々の毒素変異体を細胞に添加し、蛍光顕微鏡で毒素の結合を確認した。その結果、Fig. 21B に示すように、D81A、N82A、S83A、Y88A は野生型 α 毒素と同様な結果を示した。一方、IL-8 の遊離を示さなかった W84A と Y85A は、野生型 α 毒素と比較して細胞への結合が約 80%低下し、著しい結合の抑制が認められた。そこで、本毒素による TrkA のリン酸化を測定したところ、野生型 α 毒素と比較して、

W84A、及び、Y85A は TrkA のリン酸化を誘導しなかった (Fig. 21C)。以上より、 α 毒素のループ領域内に存在する 84 位の Trp 残基と 85 位の Tyr 残基が細胞への結合に関与することが判明した。

α 毒素の GM1a との結合に、本毒素分子内のループ領域が関与するかどうかを検討するため、BIACORE を用いて SPR (surface plasmon resonance) 解析を行った。まず、GM1a 含有リポソームを作製し、L1 センサーチップに GM1a 含有リポソームを結合させ、種々の濃度の野生型毒素または、毒素変異体をアナライトとして結合させた (Fig. 22)。その結果、D81A、N82A、S83A、Y88A の K_D 値は、34~68 nM で、野生型 α 毒素が 23 nM であることから、これらの毒素変異体は、野生型毒素と同様に GM1a 含有リポソームに結合することが明らかとなった (Table 4)。一方、W84A と Y85A は、センサーグラムの急激な低下が認められ、 K_D 値がそれぞれ、520 と 488 nM を示し、野生型と比較して、約 20 倍高い値を示した (Table 4)。すなわち、W84A と Y85A の GM1a 含有リポソームに対する結合親和性は、野生型毒素と比較して、約 20 倍低下していることが判明した。

次に、 α 毒素のループ領域と GM1a の結合について詳しく解析するために、MOE を用いて本毒素と GM1a とのドッキングシミュレーション解析を行った。その結果、Fig. 23 に示すように、 α 毒素ループ領域内の W84 と Y85 が、GM1a 構造中に存在するシアル酸およびガラクトサミンに、それぞれ水素結合、または、シアル酸糖環とのスタッキング相互作用により、 α 毒素と GM1a が非常に安定した結合構造をとることが明らかになった。

以上の結果より、本毒素構造のループ領域内に存在する 84 位の Trp 残基と 85 位の Tyr 残基が GM1a を特異的に認識して結合することが判明した。

第四節 考察および小括

【考察】

ウエルシュ菌が産生する α 毒素は、本菌感染症において様々な病態を引き起こすと報告されているが、その主要な病原性発現部位や毒素の特異的結合受容体は不明のままであった。近年、ボツリヌスA型神経毒素やディフィシル菌A毒素などの細菌毒素に対する特異的受容体が数多く発見され、特に、細胞表面に存在する糖脂質であるガングリオシドをターゲットとして認識する毒素が多数報告されている(69, 70)。本章では、 α 毒素の受容体を探索するため、ガングリオシドに着目し解析を行った。まず、本毒素とガングリオシドとの関係について検討するために、ガングリオシド生合成阻害剤、または、シアル酸切断酵素を用いて検討した。その結果、A549細胞において、 α 毒素によるIL-8遊離、及び、本毒素の結合を著しく阻害した。すなわち、 α 毒素の結合とIL-8遊離作用に、ガングリオシドが関与すると推察された。次に、本毒素が認識するガングリオシドを同定するため、糖鎖固定化アレイを用いて網羅的に解析した。その結果、 α 毒素は、GM1aに特異的に結合するが、GM1aと基本構造は同じでシアル酸の位置が異なるGT1b、GQ1b、そして、GD1bには結合しないことが判明した。すなわち、本毒素はGM1aのシアル酸の位置、つまり、コンフォメーションを特に認識していると推察される(Fig. 17B)。そこで、 α 毒素とGM1aの結合について詳しく解析するため、あらかじめBODIPY-GM1aを取り込ませた細胞における毒素の結合を観察した。その結果、 α 毒素、及び、GM1aは細胞膜上で共局在し、さらに、毒素処理した細胞では、GM1aが集合したクラスターが多数観察され、このクラスター形成部位に本毒素は局在していた。以上より、本毒素は、GM1aを特異的に認識して結合し、GM1aの細胞膜上での移動を惹起し、クラスター形成を誘導することが明らかとなった。

生体内においてGM1aは、普遍的に発現しており、ノックアウトマウスを用いた解析により、生体内におけるその機能が徐々に解明されつつある(79-82)。 α 毒素の生体内における作用とGM1aの関係は不明である。そこで、GalNAcT^{-/-}マウスとST^{-/-}マウスを

用いて、 α 毒素と GM1a との関係について *in vivo* レベルで解析した。その結果、GM1a を欠損した GalNAcT^{-/-}マウスでは、GM1a を有する ST^{-/-}マウスと比較して、本毒素による致死時間の遅延が認められた。さらに、 α 毒素と GM1a の関係を詳細に解析するために、各ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージを用いて毒素との結合を検討した。その結果、GalNAcT^{-/-}由来マクロファージでは、本毒素との結合がほとんど認められなかった。以上の結果より、生体内において、 α 毒素は、GM1a を特異的に認識して結合することが明らかとなった。すなわち、本毒素の毒性発現には、GM1a が非常に重要な役割を演じていることが示唆された。

ボツリヌス神経毒素と破傷風毒素では、ガングリオシド結合サイト、すなわち、H...SxWY...G ペプチドモチーフの存在が報告されている(88-91)。一方、Clark ら(84)は、 α 毒素のループ領域(72-93 残基)が細胞膜への結合に関与する可能性を報告した。そこで、本毒素構造内にガングリオシド結合モチーフ(H...SxWY...G)が存在するかどうかをシーケンス解析により、本毒素とボツリヌス神経毒素および破傷風神経毒素のアミノ酸配列を比較した。その結果、 α 毒素分子のループ領域内に、ガングリオシド結合モチーフが存在することが判明した。ガングリオシドとボツリヌス神経毒素、及び、破傷風神経毒素の結合に、ガングリオシド結合モチーフ内の Trp 残基と Tyr 残基が関与すると報告されている(85, 86)。そこで、 α 毒素分子のガングリオシド結合モチーフ内の Trp 残基と Tyr 残基、及び、その周辺のアミノ酸をそれぞれアラニンで置換した毒素変異体を作製した。まず、A549 細胞からの IL-8 遊離と毒素の細胞への結合を測定したところ、W84A と Y85A では、IL-8 遊離と細胞への結合が低下し、TrkA のリン酸化を誘導しなかった。以上より、本毒素のループ領域の 84 位の Trp 残基と 85 位の Tyr 残基が細胞への結合に関与することが判明した。次に、これらの残基の GM1a との結合における役割を解明するため、 α 毒素と GM1a との結合親和性について、GM1a リポソームを作製し、SPR 解析した。その結果、GM1a リポソームに対する結合親和性は、野生型毒素と比較して W84A と Y85A で低下していた。すなわち、これらの残基が α 毒素と GM1a の結合に重要な役割を演じていることが明らかとなった。そこ

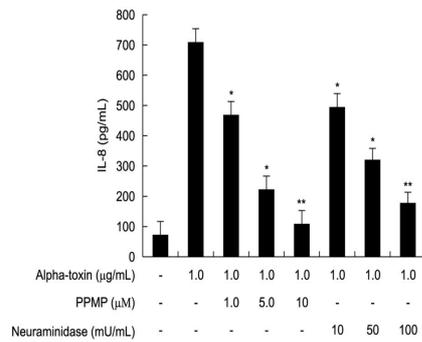
で、 α 毒素のループ領域内の W84、及び、Y85 と GM1a の糖鎖構造から MOE を用いて本毒素と GM1a のドッキングシミュレーション解析を行った。 α 毒素ループ領域内の W84 と Y85 が、GM1a 構造中に存在するシアル酸およびガラクトサミンに、それぞれ水素結合、または、シアル酸糖環とスタッキング相互作用することにより、 α 毒素と GM1a が非常に安定した結合構造をとることが明らかになった。以上の結果より、Fig. 24 に示すように、本毒素分子のループ領域内に存在する 84 位の Trp 残基と 85 位の Tyr 残基が GM1a を特異的に認識して結合し、GM1a のクラスター形成を誘導することが判明した。すなわち、 α 毒素の特異的結合受容体として、GM1a が新たに判明した。

【小括】

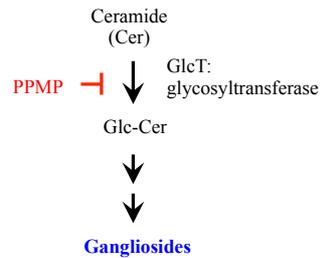
α 毒素は、A549 細胞の細胞膜上に存在する GM1a に、毒素分子内の 84 位の Trp 残基と 85 位の Tyr 残基が特異的に結合後、GM1a のクラスター化を誘導する。その結果、その近傍に存在する TrkA に作用し、一連のシグナル系の活性化を介して IL-8 の遊離を惹起することが明らかとなった。一方、 α 毒素のマウス致死活性は、GM1a 欠損マウスでは減弱することから、GM1a は、本毒素の *in vivo* での作用にも関与することが判明した。以上より、本毒素の毒性発現には、GM1a が密接に関与することが判明した。

Fig. 16. Relationship between gangliosides and release of IL-8 induced by alpha-toxin.

A)

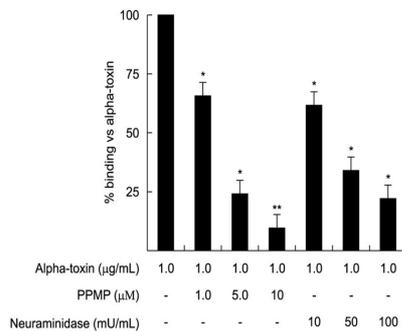


Biosynthesis of sialosyl glycosphingolipids

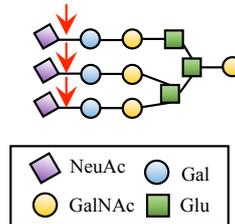


PPMP: *D*-threo-1-phenyl-2-hexadecanoylamino-3-morpholino-1-propanol

B)



Neuraminidase

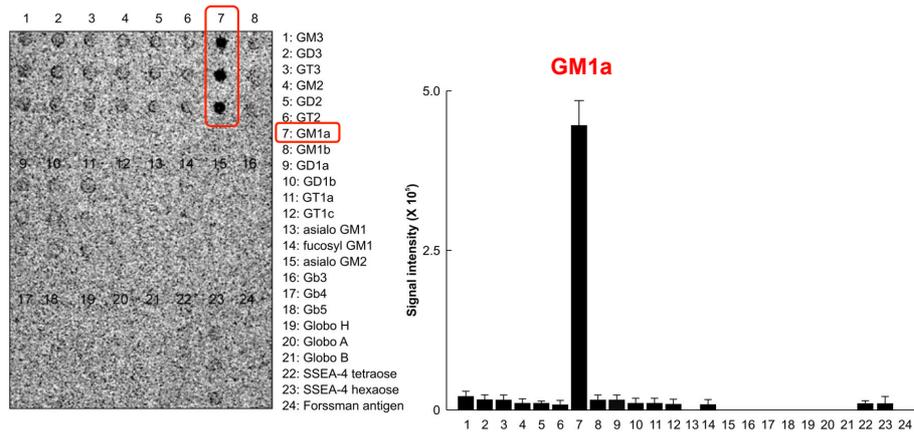


NeuAc: *N*-acetylneuramic acid (sialic acid)
 Gal: galactose
 GalNAc: *N*-acetylgalactosamine
 Glu: Glucose

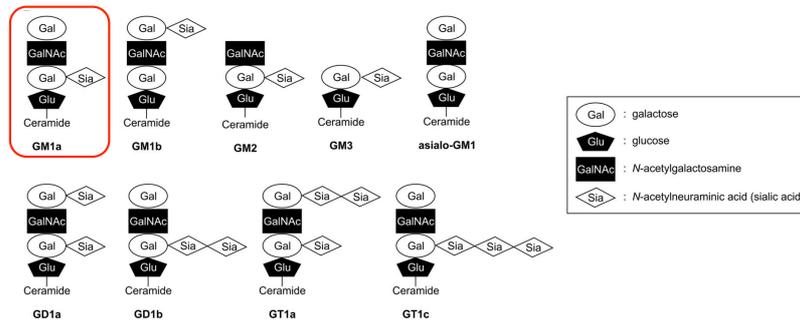
A549 cells (1.0×10^7 cells/ml) were treated with various concentrations of PPMP or neuraminidase at 37°C for 4 days or 60 min, respectively, and then the cells were incubated with $1.0 \mu\text{g/ml}$ alpha-toxin. A) IL-8 in the culture supernatants 3 h after the addition of the toxin was determined by ELISA. Values represent the mean \pm S.E.; $n = 3$; *, $p < 0.01$; **, $p < 0.005$, compared with the release of IL-8 in the cells treated with alpha-toxin. B) The pretreated cells with these inhibitors were incubated with Cy3-alpha-toxin for 15 min. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and analyzed using fluorescence microscopy. The fluorescence intensity in the visual fields was measured. The binding of alpha-toxin to the intact cells was set as the maximal response (100%) against which all other results were compared. Values represent the mean \pm S.E.; $n = 3$; *, $p < 0.01$; **, $p < 0.005$, compared with the binding of alpha-toxin in the untreated cells.

Fig. 17. Glycoarray analysis.

A)



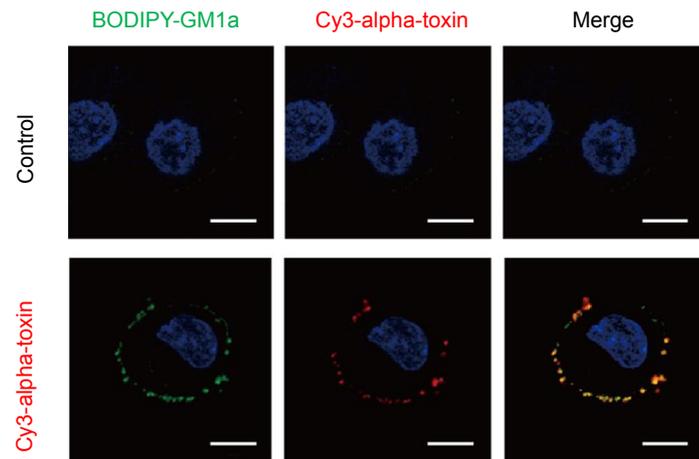
B)



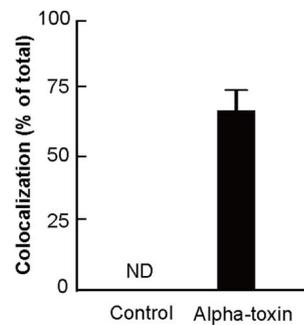
A) The glycoarray plate was incubated with 100 $\mu\text{g/ml}$ Cy3-alpha-toxin for 15 min. Fluorescence intensity of the toxin on the plate was measured with a fluorescence scanner. Values represent the mean \pm S.D. *, $p < 0.01$ ($n = 3$). SSEA-4 tetraose, Neu5Aca2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal; SSEA-4 hexaose, Neu5Aca2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc. B) Schematic figures of representative gangliosides described in the study are shown.

Fig. 18. Localization of alpha-toxin and GM1a.

A)

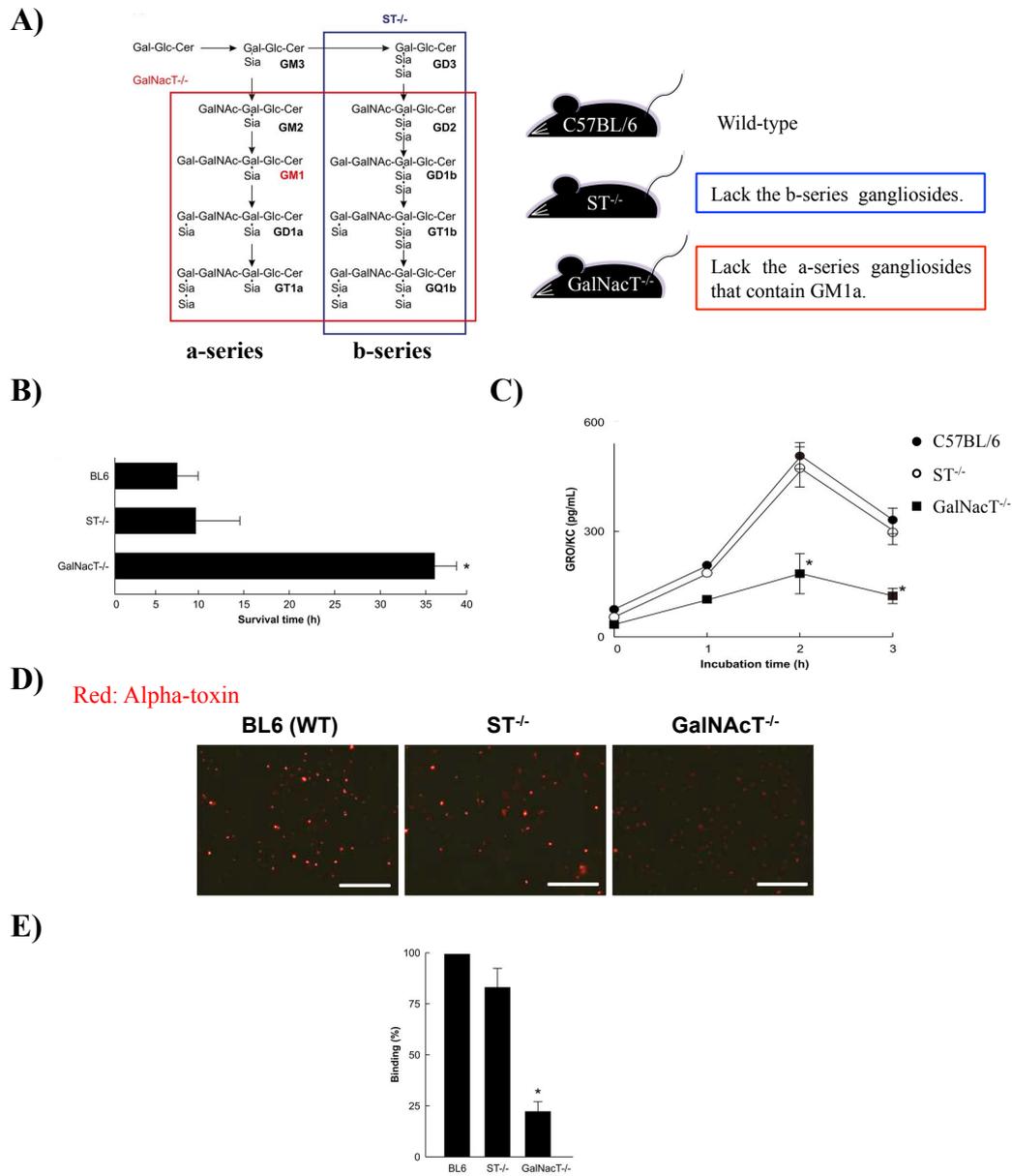


B)



A) A549 cells stained with BODIPY-GM1a (green) were incubated with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ Cy3-alpha-toxin (red) at 37°C for 15 min. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with Hoechst 33342. Alpha-toxin, GM1a, and nuclei were visualized using confocal laser microscopy. The data represent the means for three independent experiments. Scale bar, 10 μm . B) The percentage of colocalization was calculated for each combination of fluorescence markers by analysis of each confocal plane containing more than 30 cells. Values represent the mean \pm S.E.; $n = 3$; compared with the colocalization of alpha-toxin with GM1a in untreated cells. ND, not determined.

Fig. 19. Sensitivity of wild-type and knock-out mice to alpha-toxin.



A) The red or blue frame indicates the ganglioside biosynthesis pathway that is blocked in the GalNacT^{-/-} or ST^{-/-} mice, respectively. Cer, ceramide; Sia, sialic acid; LacCer, lactosylceramide. B) 25-week-old male mice weighing 25–28 g were injected intraperitoneally with 200 ng of alpha-toxin. The average survival time of 4 mice is shown. C) The macrophages from various mice were incubated with alpha-toxin for the indicated periods. GRO/KC in the serum was assayed with ELISA. Values represent the mean \pm S.E.; $n = 3$; *, $p < 0.01$, compared with the release of GRO/KC from wild-type mouse macrophages. D) The macrophages from various mice were incubated with Cy3-alpha-toxin (1.0 μ g/ml) for 15 min are shown. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and analyzed using fluorescence microscopy. The data represent the mean for three independent experiments. Scale bar, 100 μ m. E) The fluorescence intensity in the visual fields was measured. The binding of alpha-toxin to the cells from wild-type mice was set as the maximal response (100%), against which all other results were compared. Values represent the mean \pm S.E.; $n = 3$; *, $p < 0.01$, compared with the binding of alpha-toxin to macrophages from wild-type mice.

Fig. 20. Amino acid sequence alignment.

```

Alpha-toxin 65 - - - Y Q D H F W D P - - - - - D T D N N F S K D N S - W Y L A Y S I P D - - - - - G E S - Q - I 97
BoNT/A 1246 I G F I G F H Q F N N - - - - - - - I A K L V A S N W Y N R Q I E R S S R T L - - G C S W E F I 1284
BoNT/B 1234 I G L I G I H R F Y E - S G I V F E E Y K D Y F C I S K W Y L K E V K R K P Y N L K L G C N W Q F I 1282
TeNT 1264 L G L V G T H - - - N G Q I G N D N N R - D I L I A S N W Y F N H L - - - - K D K I L G C D W Y F V 1305

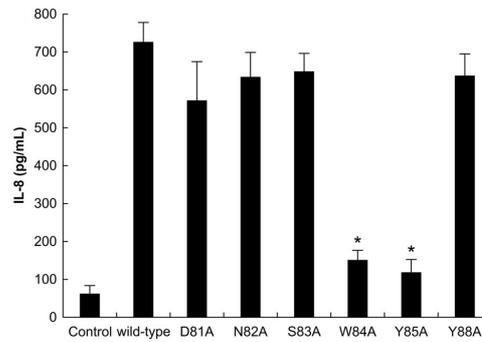
```

<p>BoNT/A: Botulinum neurotoxin A BoNT/B: Botulinum neurotoxin B TeNT: Tetanus neurotoxin</p>

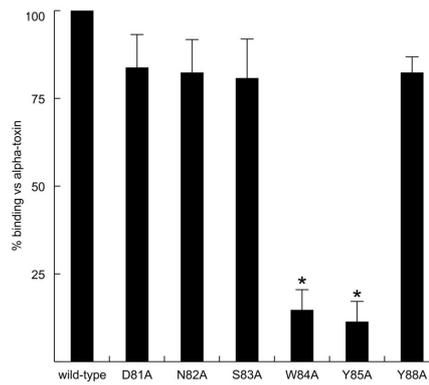
The amino acid residues forming the ganglioside-binding pocket in BoNT/A, BoNT/B, TeNT, and alpha-toxin are presented as white letters on a black background. Positions of amino acids of alpha-toxin selected for mutational analyses are highlighted by asterisks above the alpha-toxin sequence.

Fig. 21. The role of amino acids coordinated at the loop region of the alpha-toxin.

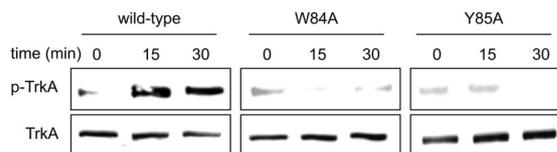
A)



B)

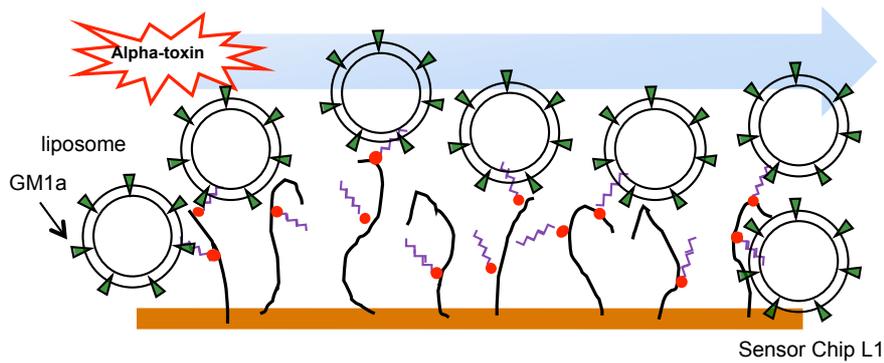
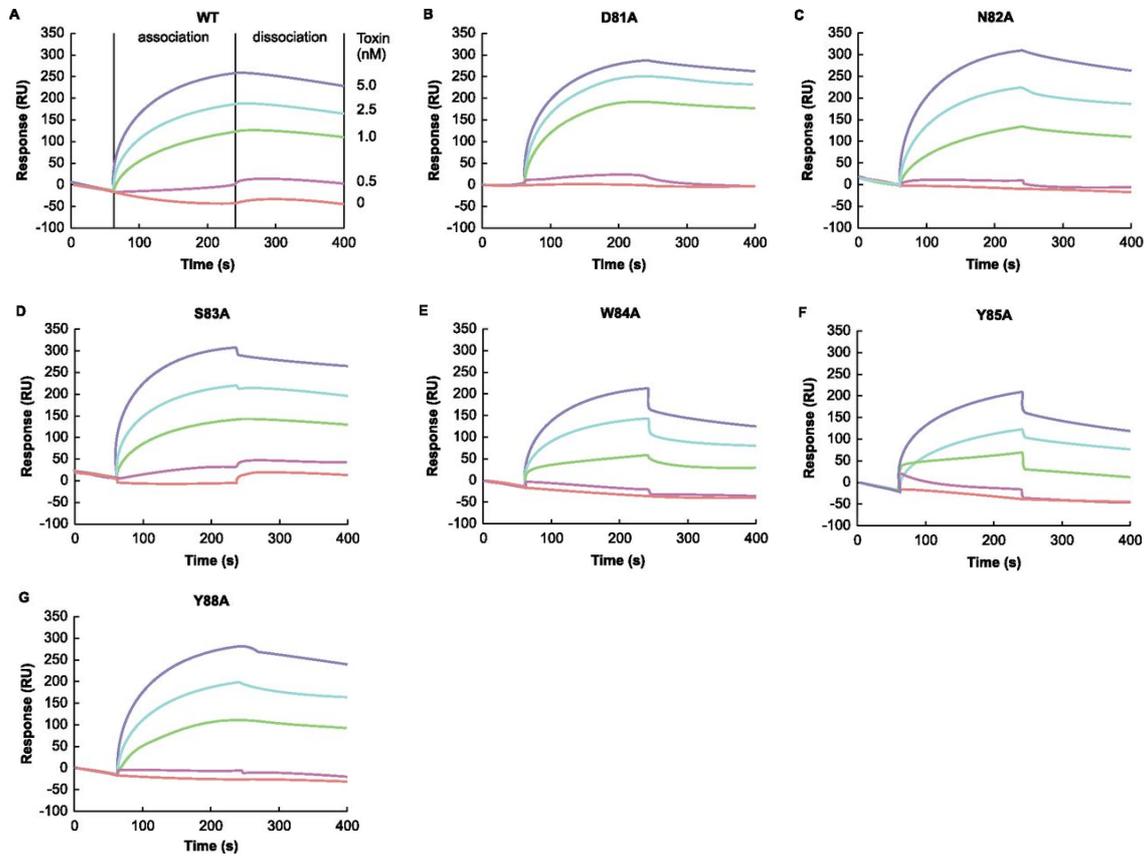


C)



A) A549 cells (1×10^7 cells/ml) were incubated with various toxins (1.0 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 3 h. IL-8 in the culture supernatants was assayed with an ELISA kit. Values represent the mean \pm S.E.; $n = 3$; *, $p < 0.005$, compared with the release of IL-8 in the cells treated with wild-type toxin. B) A549 cells (1×10^7 cells/ml) were incubated with Cy3-variant toxin (1.0 $\mu\text{g/ml}$) for 15 min. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and analyzed using fluorescence microscopy. The fluorescent intensity in the visual fields was measured. The binding of wild-type toxin to the cells was set as the maximal response (100%), against which all other results were compared. Values represent the mean \pm S.E.; $n = 3$; *, $p < 0.01$, compared with the binding of the wild-type toxin in A549 cells. C) A549 cells (1×10^7 cells/ml) were incubated with wild-type toxin or the W84A and Y85A variants at 37°C for 15 and 30 min. The lysates were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with antibodies against phosphorylated TrkA and TrkA. The data represent the mean for three independent experiments.

Fig. 22. Surface plasmon resonance analysis of binding of variants to GM1a-liposomes.



Binding of the wild-type toxin (A) and the D81A (B), N82A (C), S83A (D), W84A (E), Y85A (F), and Y88A (G) variants to GM1a-liposomes on L1 sensor chips was measured on a Biacore 3000. Blue, light blue, green, pink, and red lines indicate the concentrations of the variants with 5.0, 2.5, 1.0, 0.5, and 0 nM alpha-toxin, respectively. Association and dissociation represent the buffer in the presence or absence of the input toxins, respectively. A representative result from one of three experiments is shown.

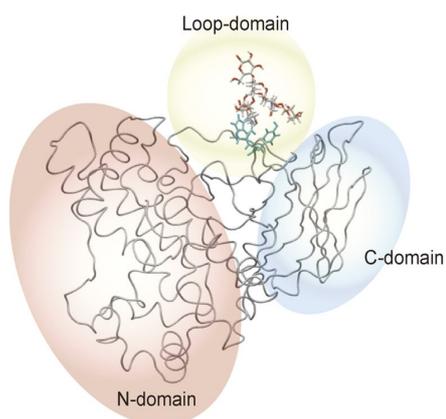
Table 4. Binding affinity of alpha-toxin variants to GM1a-liposomes.

Analyte	K_D (nM)	Fold ^a increase in K_D
Wild-type	23	1
D81A	34	1.5
N82A	54	2.3
S83A	68	2.9
W84A	520	22.6
Y85A	448	19.4
Y88A	48	2.0

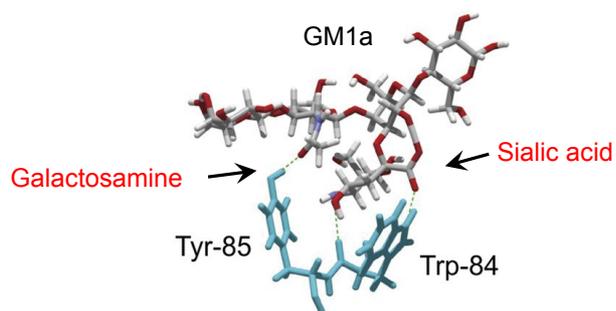
^aFold increase in K_D relative to the binding of various mutants to GM1a-liposomes

Fig. 23. Binding model of alpha-toxin and the carbohydrate moiety of GM1a.

A)

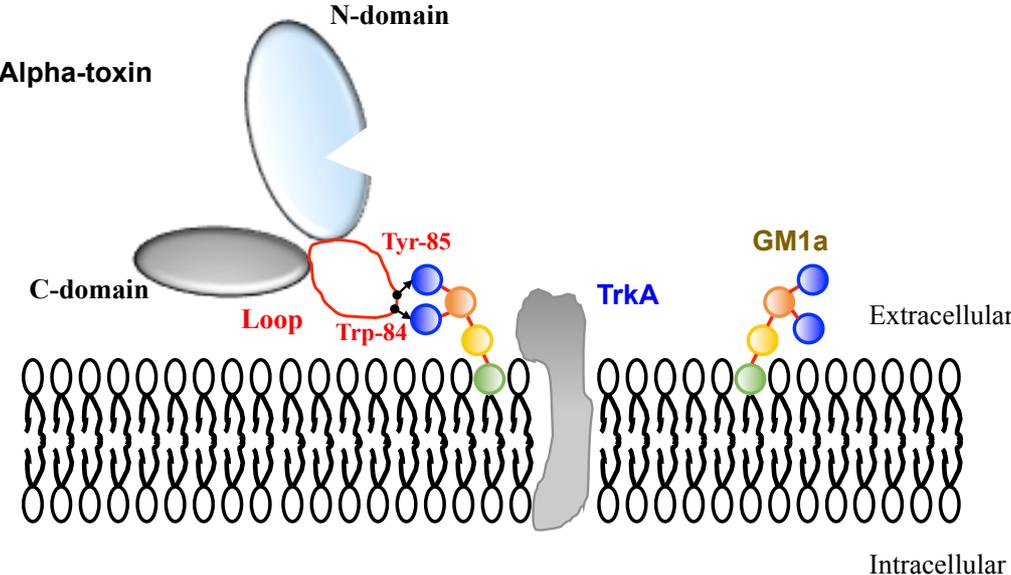


B)



A) Simulation analysis of the docking of the carbohydrate moiety of GM1a onto alpha-toxin is shown. B) The figure is a close-up view of the modeled interactions between the carbohydrate moiety of GM1a and Trp-84 and Tyr-85 of alpha-toxin. Hydrogen bonds are represented by dashed lines.

Fig. 24. Model for binding of alpha-toxin to GM1a



第三章 α 毒素受容体のクラスター形成機構の解析

細胞膜は、主にリン脂質二重層からなり、その膜の中に細胞外からの刺激を受け取る役割を持つ膜タンパク質(受容体)、細胞間の情報伝達や接着に関与する糖鎖など多様な役割を担う多数の成分で構成されている。脂質二重層の主要な構成成分であるリン脂質は、その種類や構造の違いから細胞膜の構造維持、流動性、さらには、細胞内シグナル伝達を担う機能的役割を持つことが明らかにされている。ウエルシュ菌が産生する α 毒素は、毒素自身の酵素活性として、細胞膜外層の主要な構成リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)を特異的に切断するホスホリパーゼ C(PLC)活性を有しており、その分解産物としてジアシルグリセロール(DAG)を産生する(4)。DAGは、細胞内への情報伝達シグナルなど、いわゆる、セカンドメッセンジャーとして多数の機能に関与することが明らかにされている(92-94)。また、細胞膜上に生じたDAGは、他の細胞膜構成リン脂質のフリップ-フロップを引き起こし、膜の流動性に影響を与えることが報告されている(95)。第一章で、 α 毒素によるIL-8遊離作用は、本毒素の酵素活性欠損変異体(H148G)では認められなかったことより、毒素自身が有するPLC活性、つまり、細胞膜でPLC活性により表面のPCが分解を受け、過剰なDAGの蓄積が一連の活性化の引き金となる可能性が考えられる。

前章の結果より、 α 毒素は細胞膜上でGM1aのクラスター形成を誘導したが、その作用メカニズムは不明である。そこで、PC代謝により生じた過剰なDAGが細胞膜上でGM1aのクラスター化を誘導し、IL-8遊離へと繋がる一連のメカニズムに関与していると考えた。本章では、 α 毒素によるGM1aのクラスター形成メカニズムを解明するため、本毒素処理後の細胞膜上での分子の挙動と変化に着目し、検討を行った。

第一節 α 毒素による TrkA/GM1a クラスター形成

前章より、 α 毒素は、GM1a に結合後、細胞膜上で GM1a のクラスター形成を促進することが明らかとなったが、その作用メカニズムは不明である。一方で、GM1a の近傍には、TrkA が存在し、両者はシグナル刺激により集積することが報告されている(96)。本毒素による TrkA の活性化は、酵素活性欠損変異体(H148G)では誘導されないことから、毒素自身が有する PLC 活性が GM1a のクラスター形成と、その後の TrkA の活性化に寄与していると推察した。そこで本節では、 α 毒素による GM1a クラスター化と TrkA の活性化の関係について検討した。

【実験材料及び実験方法】

1) α 毒素による GM1a クラスター化とリン酸化 TrkA の局在

A) GM1a のクラスター化

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。A549 細胞における BODIPY-GM1a の処理方法は、第二章第一節-3 を参照した。BODIPY-GM1a 処理後、 α 毒素、または、H148G を含む FBS/DMEM 培地を 200 μ l 添加した。以降、共焦点レーザー顕微鏡についての実験方法は、第一章第二節-5-B に従った。

B) リン酸化 TrkA の局在

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。ガラスボトムディッシュに播種した A549 細胞に、 α 毒素(終濃度 1.0 μ g/ml)、または、H148G(終濃度 1.0 μ g/ml)を含む FBS/DMEM 培地を 200 μ l 添加し、37°C で、1 時間インキュベーションした。その後、細胞の固定化、及び、核の染色は、第一章第二節-5-B に従って行った。次に、

3%BSA-PBS 溶液を 200 μ l 添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。細胞を PBS で 2 回洗浄後、3%BSA-PBS 溶液で 200 倍希釈した抗 P-TrkA (Tyr490) 抗体を 200 μ l 添加し、4°C で、O/N 処理した。その後、PBS で 3 回洗浄後、3%BSA-PBS 溶液で 500 倍希釈した Alexa546 ラベル抗ウサギ抗体を 200 μ l 添加し、4°C で、1 時間インキュベーションした。PBS で 3 回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡についての実験方法は、第一章第二節-5-B に従った。

【実験成績】

α 毒素による GM1a のクラスター形成に、毒素自身が有する PLC 活性が関与するかどうかを検討した。BODIPY-GM1a を取り込ませた A549 細胞に、 α 毒素、または、酵素活性欠損変異体 (H148G) を添加し、GM1a の局在を観察した。その結果、 α 毒素処理した細胞では、細胞膜上で GM1a の緑色蛍光が濃い領域、すなわち、GM1a のクラスター化が観察された。これに対して、H148G 処理では GM1a のクラスター化は認められなかった (Fig. 25A)。この結果より、本毒素の PLC 活性が GM1a のクラスター化に関与することが判明した。Ichikawa ら(96)は、GM1a のクラスター化により、TrkA が活性化され、さらに、活性化した TrkA は脂質ラフトと呼ばれる微小領域に集積することを報告した。一方、 α 毒素は細胞膜上の脂質ラフトに結合して作用することが報告されている(31)。そこで、本毒素により活性化される TrkA の細胞表面での局在を観察した。Fig. 25B で示すように、 α 毒素処理した細胞では、細胞膜上で赤色蛍光のリン酸化 TrkA の増加が観察された。一方、H148G 処理で、この作用は認められなかった。以上より、本毒素自身が有する PLC 活性が、細胞膜上で GM1a のクラスター化を誘導し、それに伴い TrkA の自己リン酸化を惹起し、GM1a/TrkA の両分子が細胞膜上に集積することが判明した。

第二節 α 毒素受容体のクラスター形成と内因性 PLC との関係

前節では、 α 毒素が GM1a に結合後、毒素自身が有する PLC 活性によって細胞膜上で GM1a クラスター形成、及び、リン酸化 TrkA の集積を誘導することを明らかにした。所属する研究室では、本毒素はウサギ好中球に作用し、TrkA を介して内因性 PLC を活性化し、活性酸素産生を惹起することを報告した(34)。すなわち、 α 毒素による細胞膜上での GM1a クラスター形成と TrkA の活性化は、本毒素による内因性 PLC の活性化が関与する可能性が考えられる。そこで、本節では α 毒素による一連の作用に内因性 PLC が関係するかどうかを検討した。

【実験材料及び実験方法】

1) α 毒素による TrkA/GM1a のクラスター化に対する内因性 PLC 阻害の効果

A) GM1a のクラスター化に対する内因性 PLC 阻害剤の効果

<実験材料>

内因性 PLC 阻害剤: U73122[Calbiochem, 662035, MW: 473.66] U73122 1.0 mg を滅菌エッペンに量り、DMSO 1,055 μ l を加えて、2 mM として調製した。

U73122 の Negative control: U73343[Calbiochem, 662041, MW: 466.66] U73343 1.0 mg を滅菌エッペンに量り、DMSO 1,071 μ l を加えて、2 mM として調製した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。ガラスボトムディッシュに播種した A549 細胞に、40 μ M U73122、40 μ M U73343、または、DMSO を添加し、37°C で、1 時間インキュベーションした。A549 細胞における BODIPY-GM1a の処理方法は、第二章第一節-3 を参照した。BODIPY-GM1a 処理後、 α 毒素、または、H148G を含む FBS/DMEM 培地を 200 μ l 添加した。以降、共焦点レーザー顕微鏡についての実験方法は、第一章第二節-5-B に従った。

B) リン酸化 TrkA の局在

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。ガラスボトムディッシュに播種した A549 細胞に、40 μ M U73122、40 μ M U73343、または、DMSO を添加し、37°C で、1 時間インキュベーションした。 α 毒素 (終濃度 1.0 μ g/ml)、または、H148G (終濃度 1.0 μ g/ml) を含む FBS/DMEM 培地を 200 μ l 添加し、37°C で、1 時間インキュベーションした。以降は、第三章第一節-1-B に従った。

2) α 毒素による IL-8 遊離と DAG 産生に対する内因性 PLC 阻害の効果

A) α 毒素による IL-8 遊離に対する内因性 PLC 阻害剤の効果

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。阻害剤の処理方法は、第三章第二節 1-A に従った。以降の実験方法は、第一章第二節-2 に従い実験を行った。

B) α 毒素による DAG 産生に対する内因性 PLC 阻害剤の効果

<実験材料>

0.2 mM KCl-5 mM EDTA 溶液: KCl 15 mg、EDTA 1.86 g を蒸留水に溶解し、全量を 1,000 ml とした。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。12 well プレートに播種した A549 細胞に、40 μ M U73122、40 μ M U73343、または、DMSO を添加し、37°C で、1 時間インキュベーションした。 α 毒素 (終濃度 1.0 μ g/ml)、または、H148G (終濃度 1.0 μ g/ml) を含む FBS/DMEM 培地を 1.0 ml 添加し、37°C で、1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、PBS 500 μ l を添加し、スクレイパーで細胞をかきとり、エッペンに移した。この操作をあと1回繰り返した。その後、3,300 rpm で 5

分間遠心した。沈殿を吸わないよう注意しながら上清を除去し、沈殿を PBS 500 μ l で懸濁して、中試験管に移した。1 サンプルに対し、クロロホルム-メタノール-酢酸-蒸留水(25:15:4:2) 500 μ l を vortex しながら添加し、続いて、クロロホルムを 600 μ l、0.2 mM KCl-5 mM EDTA を 500 μ l 加え、20 秒以上 Vortex を 3 回行い、十分混和後、2,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、下層を MS 用エッペン(Safe-Lock microcentrifuge tubes, 1.5 ml) [SIGMA, T9661-500EA] に移した後、デシケーターを用いて溶媒を 1 時間以上留去させた。その後、サンプルを保存する場合、窒素置換し、-30 $^{\circ}$ C で保存した。

C) In vitro kinase assay

< 実験材料 >

0.2 mM KCl-5 mM EDTA 溶液: KCl 15 mg、EDTA 1.86 g を蒸留水に溶解し、全量を 1,000 ml とした。

保存液の調製

•PIPES [DOJINDO, 347-02224 , M.W.302.37]

•LiCl [Nacalai tesque, 206-41 , M.W.42.39]

•エチレングリコールビス(β アミノエチルエステル)N,N,N',N'-四酢酸(EGTA) [Nacalai tesque, 152-14 , M.W.380.4]

•EDTA \cdot 4Na [Nacalai tesque, 15114-02, M.W.452.23]

PIPES 907 mg、LiCl 105 mg、EGTA 19.02 mg、EDTA 22.61 mg を蒸留水に溶解し、pH 6.8 に調製し、全量を 50 ml とし、4 $^{\circ}$ C で保存した。

DG kinase 溶液の調製: DG キナーゼ [Calbiochem, 266726] を原液のまま 5 μ l ずつエッペンに分注し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

1% 過塩素酸(PCA)の調製: 60 % PCA [Sigma, 24-1040-6] 1.0 ml を蒸留水で希釈し、全量を 60 ml とした。

界面活性剤溶液(Detergent solution)の調製

- ・カルジオリピン[Sigma, C-1649]
- ・ジエチレントリアミン五酢酸 (DETAPAC) [Sigma, D-6518]
- ・1-O-n-オクチル-β-D-グルコピラノシド [Nacalai tesque, 255-35]

カルジオリピン 4.309 ml を試験管に取り、デシケーターで溶媒を留去させた後、蒸留水で調製した 7.5 w/v% 1-O-n-オクチル-グルコシド 3.0 ml を加え超音波処理した。DETAPAC 1.2 mg を加え、VORTEX で溶解後、試験管をアルミホイルで遮光して、低温室で一晩放置後、使用するまで-20 °C で保存した。

100 mM ATP (ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATE): ATP [SIGMA, A-8937, M.W.583.4] 58.34 mg を S.D.W. (超純水) 1.0 ml に溶解した。

1 M MgCl₂: MgCl₂ [キシダ, 020-46625, M.W.95.21] 95.2 mg を S.D.W. 1.0 ml に溶解した。

25 mM PEP (PHOSPHO(ENOL)PYRUVATE): PEP [SIGMA, P-7002, M.W.240] 6.0 mg を S.D.W. 1.0 ml に溶解した。

2.5 mM NADH: NADH [SIGMA, N-8129, M.W.709.41] 1.8 mg を S.D.W. 1.0 ml に溶解した。

γ-³²P ATP [Perkin Elmer NEG002A]

C16 Ceramide [Tronto Research Chemicals Inc C262900]: C16 Ceramide 1.0 mg を CHCl₃ 100 μl で溶解した。

Kinase assay 緩衝液組成 (1 サンプルあたり多めに調製)

Detergent solutiom	20 μl
100 mM ATP	1.0 μl
1 M MgCl ₂	2.0 μl
25 mM PEP	4.0 μl
NADH	10 μl
保存液	62 μl

1.0 mg/ml DG kinase	1.0 μ l
Total	100 μ l

展開溶媒組成

Diisobutylketone : Acetic acid : D.W. = 62 : 32.5 : 5.2 v/v

Diisobutylketone [Nacalai tesque, 11535-25]

<実験方法>

サンプルに、kinase assay 緩衝液 99 μ l を加え、15 秒以上超音波処理し、よく溶かした。これ以降の操作は RI 室で行った。保存液で 10 倍希釈した γ -³²P ATP を 1.0 μ l 添加し、15 秒以上 Vortex を 2 回行い、25°C で 30 分以上インキュベーションした。次に 1% PCA を 20 μ l、クロロホルム-メタノール (1:2, v/v) 450 μ l を加え、15 秒以上 Vortex を 2 回行った。さらに、クロロホルム、及び、1% PCA をそれぞれ 150 μ l ずつ添加し、15 秒以上 Vortex を 2 回行い、十分に混和後、1,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、下層をエッペンドルフチューブに移し、デシケーターを用いて、溶媒を留去させた。(ここで冷凍庫にて保存可能。) 残渣をクロロホルム 20 μ l に溶解し、TLC プレート [Merck, 1.05715.0001] にスポット後、展開溶媒を用いて、TLC を行った。展開後、乾燥させた TLC プレートをイメージングプレート [FUJIFILM BAS-MS, 2040] に 2 時間~24 時間露光し、FLA2000 で解析した。

3) α 毒素により活性化される内因性 PLC の同定

A) α 毒素による各 PLC に対するリン酸化の検出

<実験材料>

抗 P-PLC- γ 1 抗体: Phospho-PLC- γ 1 (Ser1248) antibody [Cell signaling, 4510] を Blocking one-P で 1,000 倍希釈したものを使用した。

抗 P-PLC- γ 2 抗体: Phospho-PLC- γ 2 (Tyr759) antibody [Cell signaling, 3874] を Blocking one-P で 1,000 倍希釈したものを使用した。

抗 P-PLC- β 3 抗体: Phospho-PLC- β 3 (Ser537) antibody [Santa cruz, sc-34392] を

Blocking one-P で 1,000 倍希釈したものを使用した。

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。以降の実験方法は、第一章第二節-3 に従った。

B) PLC- γ 1 の局在

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。ガラスボトムディッシュに播種した A549 細胞に、 α 毒素(終濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$)、または、H148G(終濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を含む FBS/DMEM 培地を 200 μl 添加し、37°C で、1 時間インキュベーションした。以降は、第三章第一節-1-B に従った。

4) siRNA による内因性 PLC- γ 1 のノックダウン

A) 内因性 PLC- γ 1 のノックダウン法

<実験材料>

PLC- γ 1 siRNA の調製: FlexiTube siRNA HS_ γ 1_1 [QIAGEN, SI00041174]、FlexiTube siRNA HS_ γ 1_3 [QIAGEN, SI00041188]のそれぞれのチューブ(1.0 nmol)に、専用の RNase-free water を添加して溶解し、10 μM 溶液に調製した。使用まで -20°C で保存した。

<実験方法>

A549 細胞へのトランスフェクト法は、第一章第二節-4-A を参照した。

B) 内因性 PLC- γ 1 のノックダウン効率の確認

<実験材料>

抗 PLC- γ 1 抗体: PLC- γ 1 rabbit antibody [Cell signaling, 2822] を Blocking one で 1,000 倍希釈したものを使用した。

<実験方法>

A549 細胞へのトランスフェクト法は、第一章第二節-4-B を参照した。

C) α 毒素による内因性 PLC- γ 1 のノックダウン細胞における GM1a クラスター化

<実験方法>

第三章第二節-4-B において内因性 PLC- γ 1 のノックダウンが確認された A549 細胞をガラスボトムディッシュに播種した。BODIPY-GM1a の処理方法は、第二章第一節-3 を参照した。BODIPY-GM1a 処理後、 α 毒素(終濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を含む FBS/DMEM 培地を 200 μl 添加した。以降、共焦点レーザー顕微鏡についての実験方法は、第一章第二節-5-B に従った。

D) α 毒素による内因性 PLC- γ 1 のノックダウン細胞における IL-8 遊離

<実験方法>

第三章第二節-4-B において内因性 PLC- γ 1 のノックダウンが確認された A549 細胞を 24 well プレートに播種した。以降の実験方法は、第一章第二節-2 に従った。

【実験成績】

所属する研究室では、これまでに α 毒素による内因性 PLC の活性化は、本毒素による様々な毒性発現に重要な役割を演じていることを明らかにした(34)。一方、TrkA の下流シグナル分子の一つとして内因性 PLC が報告されている(97)。そこで、本毒素による GM1a クラスター形成に内因性 PLC の活性化が関与するかどうかを検討した。あらかじめ内因性 PLC 阻害剤(U73122)、または、その Negative-control(U73343)で処理した A549 細胞に、BODIPY-GM1a を取り込ませ、 α 毒素を添加して GM1a の局在を観察した。Fig. 26A, B に示すように、本毒素単独処理、または、U73343 で前処理した細胞では、細胞膜上で α 毒素による GM1a の緑色蛍光が強くなるクラスター化が観察され、約 80% の細胞でクラスター化が認められた。一方、U73122 を前処理した細胞では、細胞膜上での GM1a クラスター化が阻害され、GM1a のクラスター化が認められた細胞は約 30% であった。次に、本毒素による細胞膜上での TrkA の活性化に内因性 PLC が関与するかを検討した。その結果、 α 毒素単独処理、または、U73343 で前処理した細胞では、リン酸化 TrkA が認められ、約 80% の細胞で認められた。これに対し、U73122 前処理では、 α 毒素による細胞膜上でのリン酸化 TrkA の集積が減少し、その割合は約 25% であった (Fig. 26C, D)。以上より、本毒素による細胞膜上での GM1a クラスター化、及び、TrkA のリン酸化に、内因性 PLC が関与すると考えられる。

次に、 α 毒素による内因性 PLC の活性化と、それにより産生される DAG の IL-8 遊離における役割を検討した。まず、本毒素による IL-8 遊離と内因性 PLC との関係を解析したところ、Fig. 27A に示すように、本毒素単独処理で、A549 細胞からの IL-8 の著しい遊離が認められた。また、U73343 と毒素でも同様に増加した。一方、U73122 処理では、処理濃度に依存して本毒素による IL-8 遊離が抑制された。次に、 α 毒素による DAG 産生に対する内因性 PLC の関与を検討した。その結果、 α 毒素単独処理、または、U73343 前処理の場合と比較して U73122 は、 α 毒素による DAG 産生を阻害剤処理濃度依存的に阻害した (Fig. 27B)。第一章第一節の Fig. 7 で示したように、 α 毒素の酵素活性欠損変異体 (H148G) では、IL-8 遊離と DAG 産生を示さないことより、本

毒素自身が有する PLC 活性、及び、内因性 PLC の両方の酵素活性により、DAG が過剰に産生され、IL-8 の遊離を惹起すると考えられる。

Obermeierら(98, 99)は、TrkA は PLC- γ と相互作用することを報告している。そこで、 α 毒素により活性化される内因性 PLC を同定するために、PLC- γ 1、PLC- γ 2、及び、PLC- β 3 に着目し、これらの抗リン酸化抗体を用いて α 毒素によるリン酸化を検討した。Fig. 28A, B に示すように、本毒素は、1 分後から PLC- γ 1 のリン酸化を引き起こし、15 分で最大となった。これに対し、PLC- γ 2、及び、PLC- β 3 のリン酸化は本毒素処理で認められなかった。一方、H148G 処理では、いずれのリン酸化も引き起こさなかった。次に、本毒素処理による細胞内でのリン酸化 PLC- γ 1 の局在を抗リン酸化 PLC- γ 1 抗体を使用して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。 α 毒素を処理した細胞では、細胞膜上で多数のリン酸化 PLC- γ 1 の集積が観察され、約 65%の細胞で認められた。これに対し、H148G 処理ではリン酸化 PLC- γ 1 はほとんど検出されなかった (Fig. 28 C, D)。そこで、PLC- γ 1 の役割をさらに検討するため、RNAi 法を用いて特異的に PLC- γ 1 発現をノックダウンした A549 細胞を作製した。Fig. 29A に示すように、PLC- γ 1 特異的 siRNA をトランスフェクトした細胞では、Intact 細胞や NC-siRNA をトランスフェクトした細胞と比較して、PLC- γ 1 のバンドが減少し、ノックダウンが認められた。そこで、これらの細胞に BODIPY-GM1a を取り込ませて、 α 毒素を添加し、GM1a のクラスター形成を観察したところ、Intact、または、NC-siRNA 処理細胞と比較して、PLC- γ 1 をノックダウンした細胞の細胞膜上での GM1a クラスター形成が大きく低下した (Fig. 29B)。次に、 α 毒素による IL-8 の遊離について、これらの細胞を用いて測定したところ、PLC- γ 1 をノックダウンした A549 細胞では、IL-8 遊離が有意に阻害された (Fig. 29C)。以上の結果より、本毒素は細胞膜上で内因性 PLC- γ 1 の活性化により DAG を産生して、これが GM1a のクラスター化を誘導し、その後、IL-8 の遊離を惹起すると考えられる。

第三節 α 毒素による膜ダイナミクスの変化

前述のように、 α 毒素による DAG 産生は、IL-8 遊離に関与することが判明している。しかしながら、DAG が IL-8 遊離にどのように関与しているのか詳細については不明である。Oancea ら(100)は、プロテインキナーゼ C (PKC) γ の C1A と C1B ドメインが DAG を特異的に結合すると報告している。そこで、PKC γ の C1A、及び、C1B ドメインに EYFP をフュージョンしたタンパク (EYFP-C1AB) を発現する細胞を用いて(101)、 α 毒素による DAG の挙動について解析を行った。さらに、細胞膜上で DAG が産生されると、膜の流動性が増加することが報告されている[95]。すなわち、 α 毒素による GM1a のクラスター形成、及び、TrkA の集積には、膜の流動性に関与すると推察した。そこで、本毒素処理後の膜の流動性の変化を Annexin V を使用したフリップ-フロップで測定した。

【実験材料及び実験方法】

1) α 毒素による DAG の細胞膜上での挙動

<実験材料>

EYFP-C1AB: 209PKC γ C1AB-EYFP [独立行政法人理化学研究所小林脂質生物学研究室より供与して頂いた]

<実験方法>

A549 細胞への EYFP-C1AB のトランスフェクト法は、第一章第二節-4-A を参照した。トランスフェクトしてガラスボトムディッシュに播種し 24 時間後、 α 毒素(終濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$)、または、H148G(終濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を含む FBS/DMEM 培地を 200 μl 添加し、第三章第一節-1-B に従い、共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察を行った。

2) α 毒素による Flip-flop の検出

<実験材料>

Annexin-V-FLUOS staining kit: [Roche, 11858777001]

<実験方法>

細胞の培養は、第一章第二節-1 を参照した。ガラスボトムディッシュに播種した A549 細胞に、 α 毒素(終濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$)、または、H148G(終濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$)を含む FBS/DMEM 培地を 200 μl 添加し、37°C で、種々の時間インキュベーションした。その後、PBS で 2 回洗浄し、Annexin-V-FLUOS 入り FBS/DMEM 培地を添加し、室温で 15 分間インキュベーションした。PBS で 2 回洗浄後、第三章第一節-1-B に従った。

【実験成績】

α 毒素により産生される DAG の挙動と役割を明らかにするために、EYFP-C1AB 遺伝子をコードするプラスミドベクターを A549 細胞にエレクトロポレーション法により導入して強制発現させた。この細胞に α 毒素、または、H148G を添加し、経時的に共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。Fig. 30A に示すように、細胞質内で局在していた EYFP-C1AB は、本毒素処理 2 分後から細胞膜上に移動し始め、細胞膜上に多く集積し、その局在は 30 分以上持続した。一方、H148G 処理では EYFP-C1AB の挙動の変化は認められなかった (Fig. 30B)。以上より、 α 毒素は細胞に作用後、初期において細胞膜上で DAG を強力に産生し、その作用は毒素自身の PLC 活性と密接に関与することが判明した。

細胞膜外層で産生した DAG は、膜の流動性の変化を誘導し、その指標として、細胞膜脂質二重層内のリン脂質の上下の転移を示すフリップ-フロップが報告されている (95)。そこで、細胞膜上でのホスファチジルセリン (PS) の露出をフリップ-フロップのマーカーとして検出した。 α 毒素を種々の時間 A549 細胞とインキュベーションし、PS に特異的に結合する Annexin V を添加して細胞を観察した。その結果、Fig. 31A に示すように、本毒素処理 10 分後から細胞膜上で Annexin V の結合が認められ、時間経過とともに増加した。これに対し、H148G で処理した細胞では、この変化は認められなかった (Fig. 31B)。以上より、本毒素処理により細胞膜外層で生じた DAG の作用によりフリップ-フロップを引き起こし、PS の露出を誘導すると考えられ、膜の流動性が変化したと考えられる。

第四節 考察および小括

【考察】

α 毒素は細胞膜のリン脂質成分である、PC、そして、PI を基質として認識し、PLC 活性により DAG 産生を誘導する(102)。 α 毒素の酵素活性を欠損させた変異体 (H148G)では、毒素活性を示さないことから、毒素自身が有する PLC 活性が毒性発現に密接に関与すると考えられる。そこで、本毒素の PLC 活性が細胞膜上での GM1a クラスター形成に関与するかどうかを検討すると、 α 毒素は細胞膜上で GM1a のクラスター形成を引き起こしたが、H148G では認められなかった。Ichikawa ら(96)は、GM1a の近傍には、TrkA が存在し、GM1a の刺激により両者は集積し、TrkA が活性化され、さらに、活性化した TrkA は脂質ラフトに集積することを報告している。そこで、本毒素の TrkA に対する作用を検討すると、 α 毒素処理した細胞では、細胞膜上で TrkA のリン酸化が観察されたが、H148G 処理では認められなかった。すなわち、 α 毒素は、GM1a に結合後、本毒素自身の酵素活性により細胞膜表面のリン脂質を切断してそれが引き金となり、GM1a のクラスター化と TrkA のリン酸化を誘導すると考えられる。一方、所属する研究室では、本毒素はウサギ好中球に作用して、TrkA を介して内因性 PLC を活性化し、活性酸素産生を惹起することを報告した(34)。また、TrkA の下流に存在するシグナル分子として内因性 PLC が報告されている(97)。このことから、 α 毒素による細胞膜上での GM1a クラスター形成と TrkA の活性化に、内因性 PLC が関与すると推察された。そこで、内因性 PLC 阻害剤 (U73122)を用いて検討したところ、本毒素による細胞膜上での GM1a クラスター化、及び、IL-8 遊離は、内因性 PLC 阻害剤で抑制された。さらに、内因性 PLC 阻害剤は、 α 毒素による細胞膜上での TrkA のリン酸化を抑制した。以上より、 α 毒素は細胞膜上で本毒素自身の PLC 活性により、細胞膜表面のリン脂質が一部切断され、これによって初期の GM1a クラスター化が亢進し、その刺激で TrkA、さらに、その下流シグナル分子の内因性 PLC が活性化される。その後、生じた過剰の DAG が強力的に GM1a クラスター形成、及び、TrkA のリン酸化、そして、内因性 PLC を活性化することが明らかとなった。

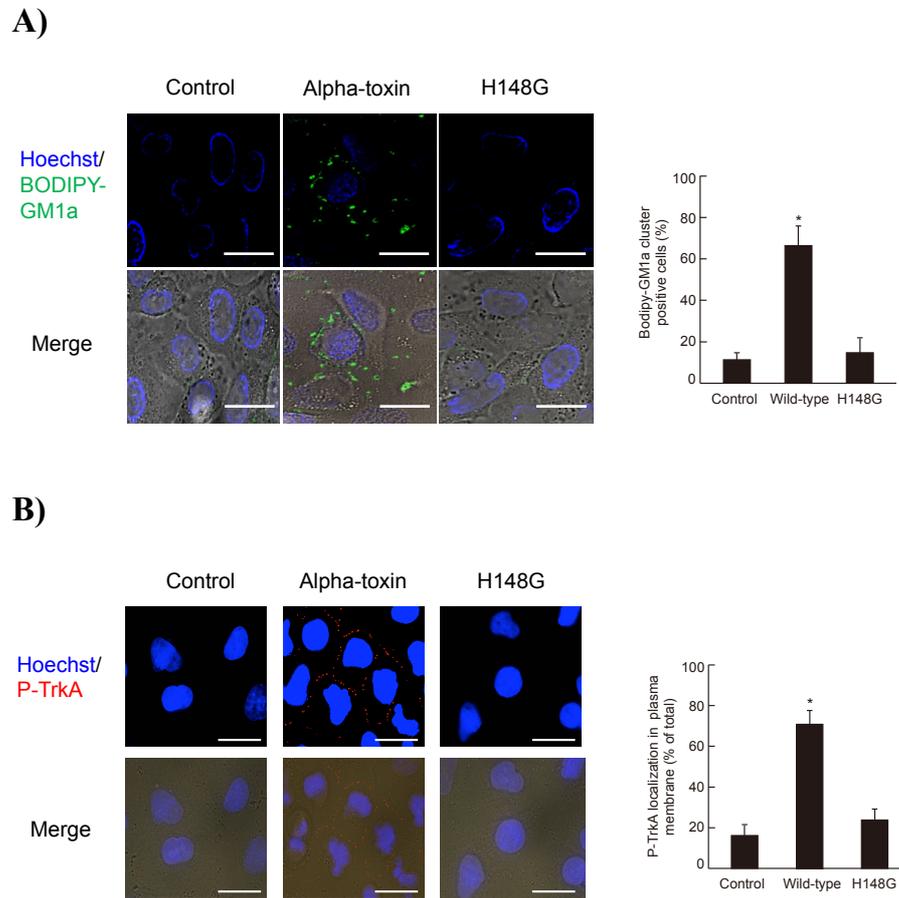
内因性 PLC は、PIP₂ を基質として分解し、DAG を産生する。内因性 PLC 阻害剤が、 α 毒素による DAG 産生を抑制したことから、本毒素による IL-8 遊離には、DAG 産生が密接に関与していると考えられた。Obermeier ら(98, 99)は、TrkA は PLC- γ と相互作用することを報告している。そこで、 α 毒素により活性化される内因性 PLC を同定するために、PLC- γ 1、PLC- γ 2、及び、PLC- β 3 に着目し、これらの抗リン酸化抗体を用いて検討を行った。その結果、本毒素は、PLC- γ 1 を特異的にリン酸化し、一方、H148G 処理では、いずれのリン酸化も引き起こさなかった。さらに、 α 毒素を処理した細胞では、細胞膜上で多数のリン酸化 PLC- γ 1 の集積が観察された。そこで、RNAi 法を用いて特異的に PLC- γ 1 発現をノックダウンした A549 細胞を用いて解析したところ、本毒素による細胞膜上での GM1a のクラスター形成、及び、IL-8 遊離が阻害された。すなわち、本毒素自身が有する PLC 活性による初期の GM1a クラスター化が TrkA を刺激して、内因性 PLC- γ 1 を活性化することにより、DAG が過剰に産生され、その後、強力的に GM1a のクラスター化を誘導し、IL-8 の遊離が惹起されると推察された。

これまでの解析結果より、 α 毒素の DAG 産生作用は、IL-8 遊離に関与することを明らかにしているが、DAG の挙動と役割の詳細については不明である。そこで、PKC γ の C1A、及び、C1Bドメインに EYFP がフュージョンしたタンパク(101)をマーカーとして、 α 毒素による DAG の挙動について解析を行った。その結果、細胞内で局在していた EYFP-C1AB は、本毒素処理により細胞膜上へと局在が変化した。すなわち、本毒素は、細胞膜上で急激に DAG を産生していることが判明した。次に、細胞膜外層で産生した DAG は、膜の流動性を変化させ、フリップ-フロップを引き起こすと報告されている(95)。そこで、細胞膜上でのホスファチジルセリン(PS)の露出をフリップ-フロップの指標として検出すると、 α 毒素は、細胞膜上での PS の露出を誘導した。以上より、本毒素処理により細胞膜外層で生じた DAG が膜の流動性に変化を与え、GM1a のクラスター化などの一連の活性化に関与すると推察された。

【小括】

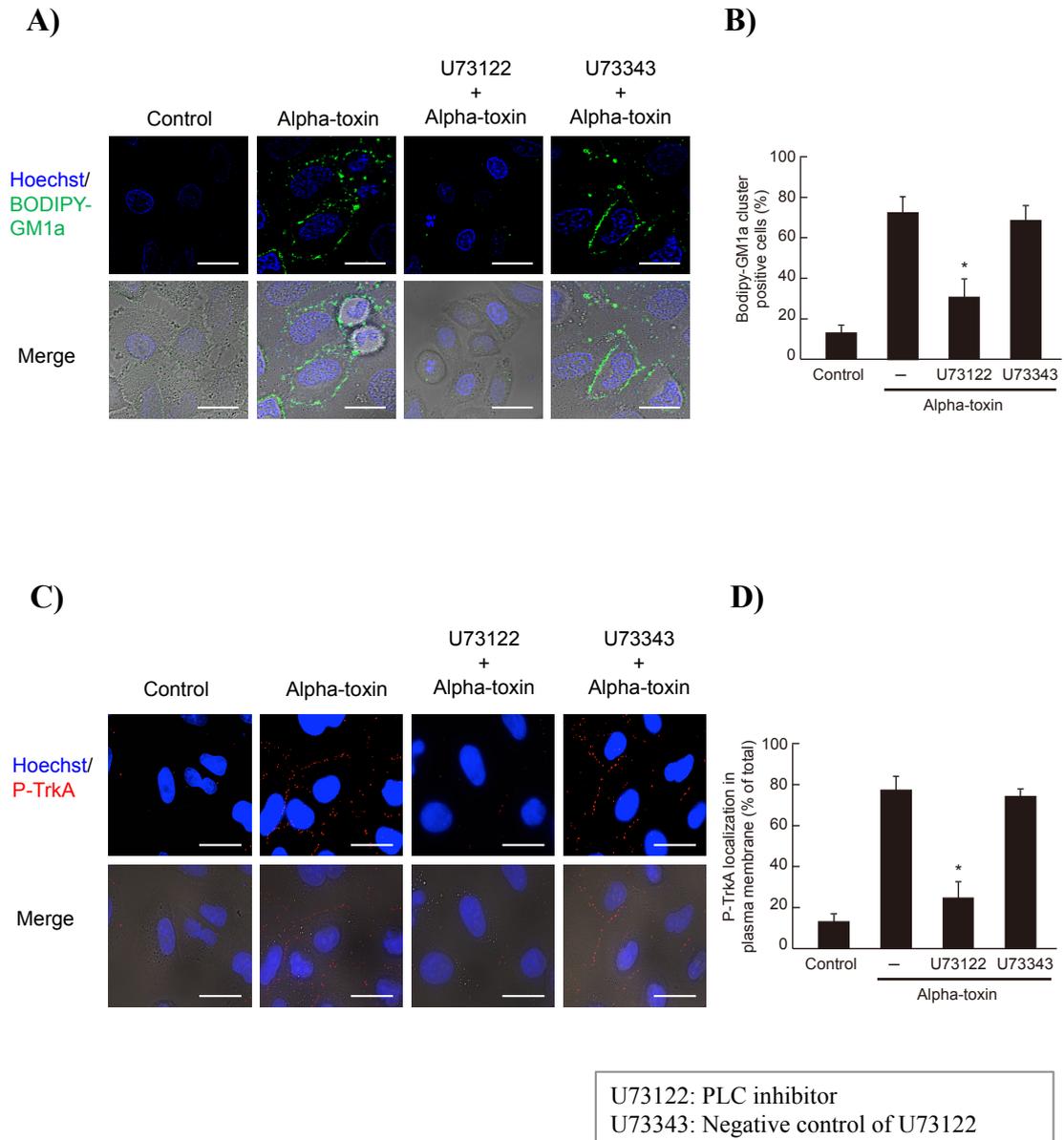
α 毒素は、A549 細胞の細胞膜上に存在する GM1a に特異的に結合後、毒素自身の PLC 活性によって細胞膜外層で DAG を産生する。生じた DAG は、フリップ-フロップを誘導して細胞膜の流動性を亢進させ、GM1a のクラスター化を誘導し、その刺激が TrkA の自己リン酸化を引き起こす。活性化された TrkA は、その下流に存在する内因性 PLC- γ 1 を活性化して、さらなる DAG 産生を亢進させる。その後、細胞膜上で過剰に生じた DAG は、TrkA をより一層強力に活性化し、IL-8 の大量遊離を惹起すると考えられる。

Fig. 25. Clustering of GM1a and phosphorylation of TrkA in the membrane of cells treated with alpha-toxin.



(A) A549 cells stained with BODIPY-GM1a were incubated with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ wild-type or H148G at 37°C for 60 min. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with Hoechst 33342. GM1a (green) and nuclei (blue) were visualized by fluorescence microscopy. Scale bar, 10 μm . (B) Bodipy-GM1a fluorescence intensity was measured. Values represent the mean \pm SE; n = 3; *, p < 0.01, compared with the control. (C) A549 cells were incubated with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ wild-type or H148G at 37°C for 60 min. The cells were fixed, permeabilized, and stained with phospho-TrkA antibody and Hoechst 33342. Phospho-TrkA (red) and nuclei (blue) were visualized by fluorescence microscopy. Scale bar, 10 μm . (D) Phospho-TrkA fluorescence intensity was measured. Values represent the mean \pm SE; n = 5; *, p < 0.01, compared with the control.

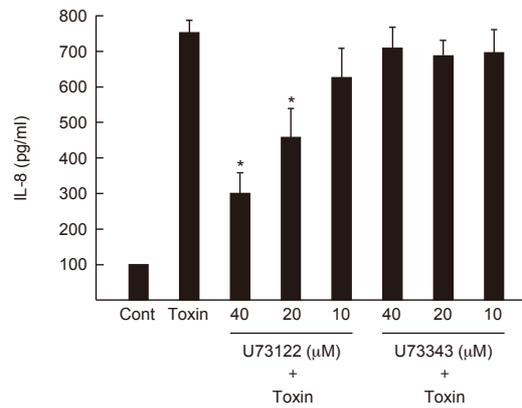
Fig. 26. Inhibition of endogenous PLC affected the clustering of GM1a and phosphorylation of TrkA.



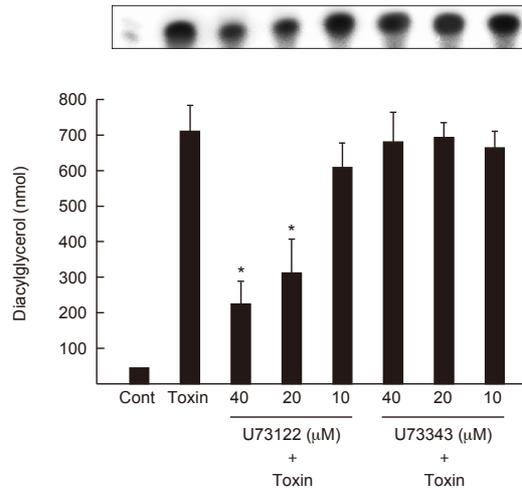
(A) A549 cells were preincubated with 40 μ M U73122 (endogenous PLC inhibitor) or U73343 (U73122 analogue) at 37°C for 60 min. The treated cells were stained with BODIPY-GM1a and incubated with 1.0 μ g/ml wild-type or H148G at 37°C for 60 min. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with Hoechst 33342. GM1a (green) and nuclei (blue) were visualized by fluorescence microscopy. Scale bar, 10 μ m. (B) Bodipy-GM1a fluorescence intensity was measured. Values represent the mean \pm SE; n = 3; *, p < 0.01, compared with the BODIPY-GM1a clustering induced by alpha-toxin. (C) A549 cells were preincubated with 40 μ M U73122 or U73343 at 37°C for 60 min. The treated cells were incubated with 1.0 μ g/ml wild-type or H148G at 37°C for 60 min. The cells were fixed, permeabilized, and stained with phospho-TrkA antibody and Hoechst 33342. Phospho-TrkA (red) images and nuclei (blue) were visualized by fluorescence microscopy. Scale bar, 10 μ m. (D) Phospho-TrkA fluorescence intensity was measured. Values represent the mean \pm SE; n = 5; *, p < 0.01, compared with the phosphorylation of TrkA induced by alpha-toxin.

Fig. 27. Inhibition of endogenous PLC prevented the alpha-toxin-induced release of IL-8 and formation of diacylglycerol.

A)



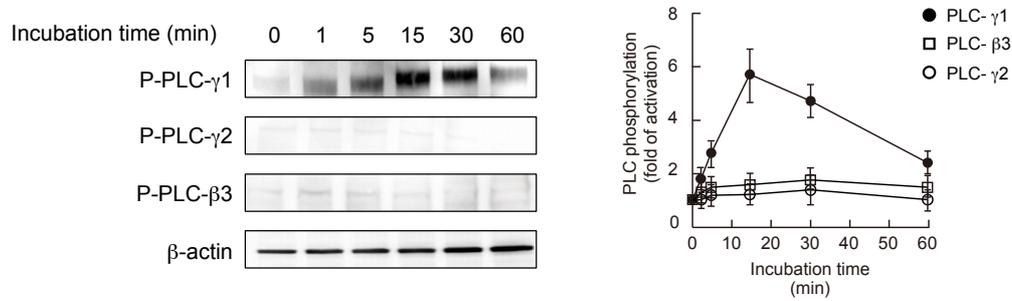
B)



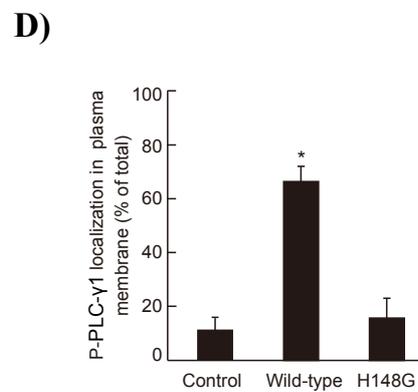
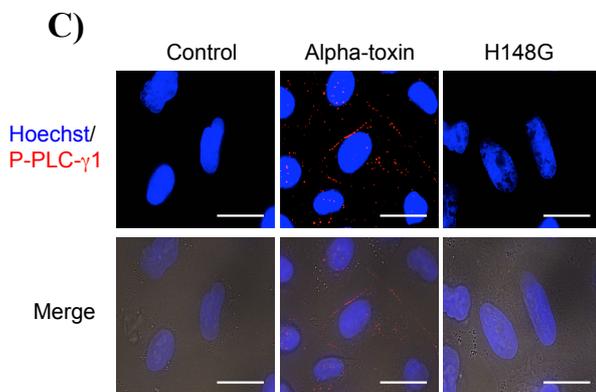
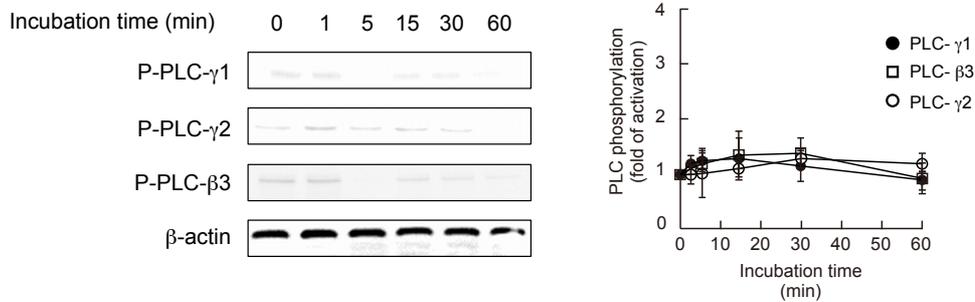
(A) A549 cells were pretreated with various amounts of U73122 or U73343 at 37°C for 60 min, and then incubated with or without alpha-toxin (1.0 μg/ml) at 37°C for 3 h. The concentration of IL-8 in culture supernatants was determined by ELISA. Values represent mean ± S.E.; n = 4; *, p < 0.01, compared with the release of IL-8 induced by alpha-toxin. (B) A549 cells were pretreated with various amounts of U73122 or U73343 at 37°C for 60 min, and then incubated with or without alpha-toxin (1.0 μg/ml) at 37°C for 60 min and intracellular DAG levels were determined. Values represent mean ± S.E.; n = 4; *, p < 0.01, compared with the levels of DAG induced by alpha-toxin.

Fig. 28. Alpha-toxin stimulated the phosphorylation of phospholipase C γ -1.

A) Alpha-toxin

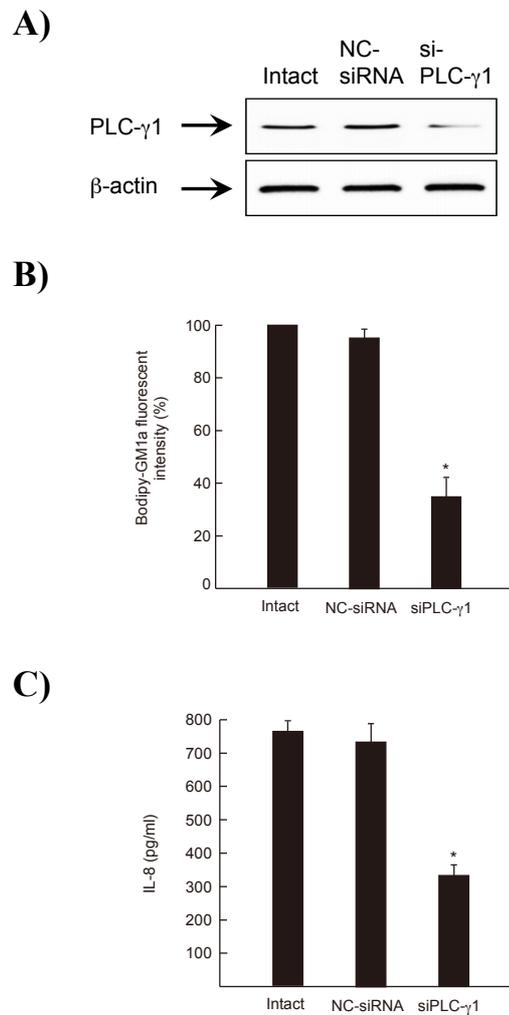


B) H148G



(A) A549 cells were incubated with 1.0 μ g/ml wild-type or 1.0 μ g/ml H148G at 37°C. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and blotted with antibodies to phospho-PLC- γ 1, phospho-PLC- γ 2, and phospho-PLC- β 3. (B) Phosphorylation of PLC- γ 1 (black circles), PLC- γ 2 (white circles), and PLC- β 3 (white squares) in untreated cells was set to 1. Values represent the mean \pm SE; n = 5. (C) A549 cells were incubated with 1.0 μ g/ml wild-type or H148G at 37°C for 60 min. The cells were fixed, permeabilized, and stained with phospho-PLC- γ 1 antibody and Hoechst 33342. Phospho-PLC- γ 1 (red) and nuclei (blue) were visualized by fluorescence microscopy. Scale bar, 10 μ m. (D) Phospho-PLC- γ 1 fluorescence intensity was measured. Values represent the mean \pm SE; n = 5; *, p < 0.01, compared with the phosphorylation of PLC- γ 1 induced by alpha-toxin.

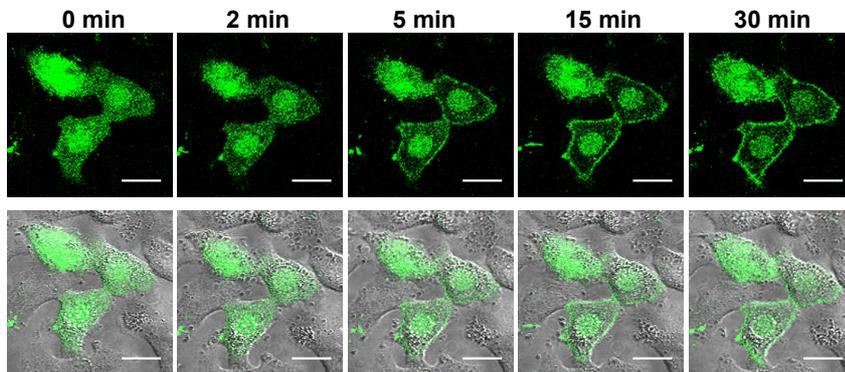
Fig. 29. Effect of siRNA on clustering of GM1a and release of IL-8.



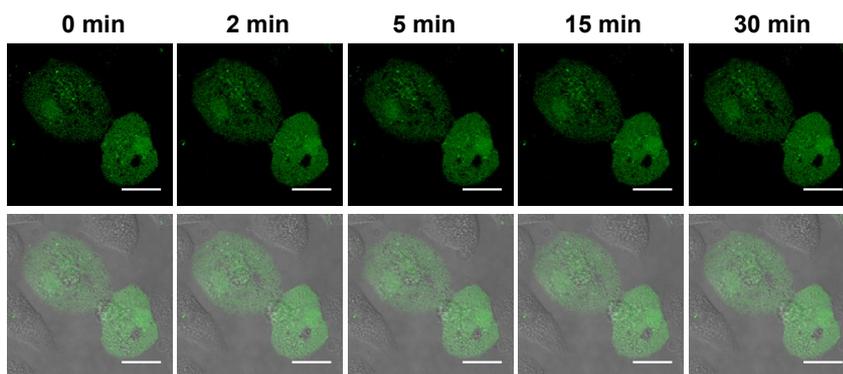
(A) A549 cells were transfected with siPLC- γ 1 or NC-siRNA (10 nM). Expression of PLC- γ 1 was detected by western blotting with anti-PLC- γ 1 and anti- β -actin antibodies. (B) Intact cells, NC-siRNA-treated cells, or siPLC- γ 1-treated cells were stained with BODIPY-GM1a and incubated with 1.0 μ g/ml alpha-toxin at 37°C for 60 min. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and analyzed by fluorescence microscopy. Fluorescence intensity was measured. The clustering of GM1a in the intact cells was set as the maximal response (100%) against which all other results were compared. Values represent the mean \pm SE; n = 3; *, p < 0.01. (C) siRNA-treated cells were incubated with 1.0 μ g/ml alpha-toxin at 37°C for 3 h. The concentration of IL-8 in the culture supernatants was determined by ELISA. Values represent the mean \pm SE; n = 5; *, p < 0.01, compared with the release of IL-8 induced by alpha-toxin.

Fig. 30. Transbilayer movement of DAG on the membrane treated with alpha-toxin.

A) Alpha-toxin



B) H148G



DNA transfection was used to express EYFP-C1AB in A549 cells. After 24 h, cells were incubated with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ wild-type (A) or H148G (B) at 37°C. The cells were visualized by confocal fluorescence microscopy. Scale bar, 10 μm .

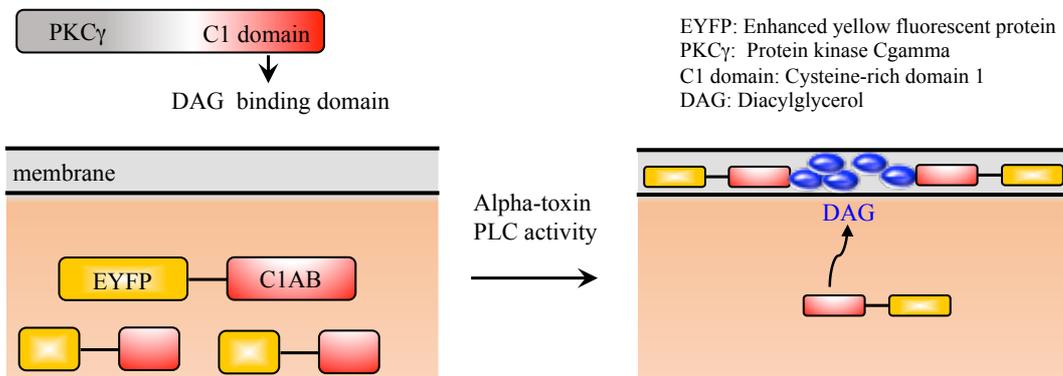
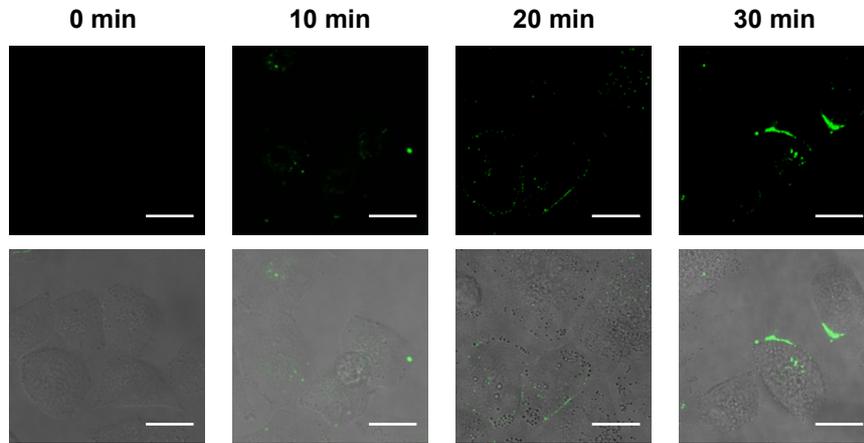
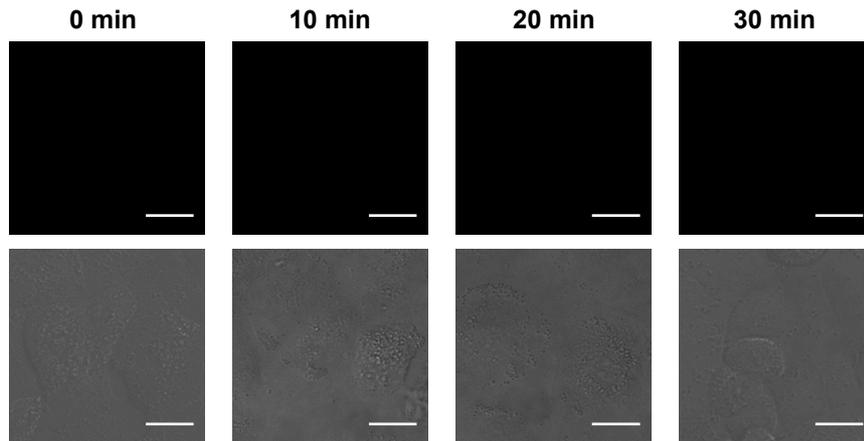


Fig. 31. Alpha-toxin induced flip-flop motion in A549 cells.

A) Alpha-toxin



B) H148G



A549 cells were treated with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ wild-type (A) or H148G (B) in the presence of Alexa Fluor 488-conjugated annexin V. Fluorescence and differential interference contrast images were acquired at 0, 10, 20, and 30 min after the addition of alpha-toxin. Scale bar, 10 μm .

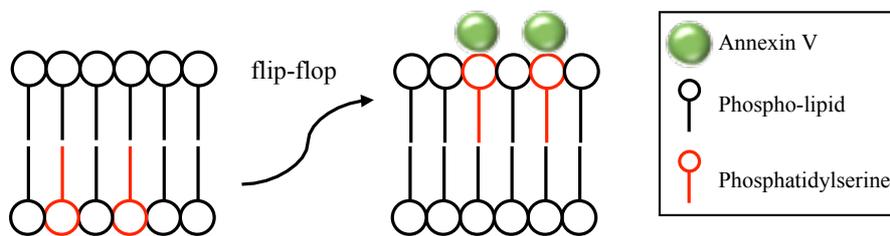
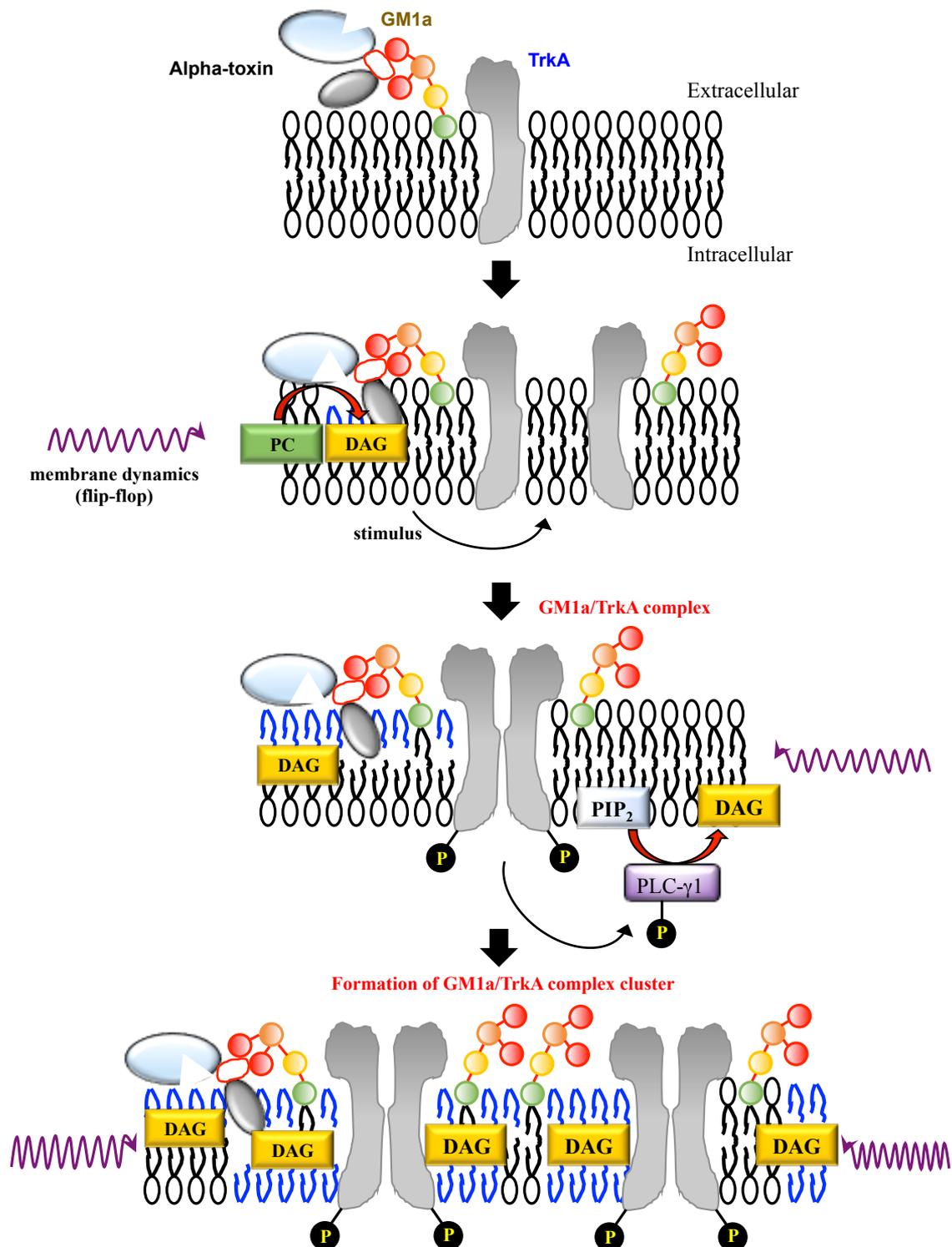


Fig. 32. Schematic model of alpha-toxin-induced membrane dynamics and accumulation of the GM1a/TrkA complex.



第四章 総括および結論

【総括】

ウエルシュ菌は創傷部位より侵入し、ガスの発生を伴う組織の破壊を主症状とするガス壊疽を発症する。本感染症の特徴的な所見としては、感染組織周辺の血管内で、好中球の集積と接着活性の亢進による異常な凝集体を形成することである。すなわち、本菌感染による異常な好中球の活性化のメカニズムを解明することで、ウエルシュ菌感染に対する有効な治療への応用に期待できる。これまでに、本毒素は好中球を活性化することが報告されている(34)。そこで、本菌感染症における α 毒素の関与を明らかにするため、 α 毒素の好中球に対する作用を検討した。まず、本毒素を投与したマウスでは、肺や肝臓の血管内において、好中球の集積が観察されたが、組織内への浸潤は認められなかった。すなわち、 α 毒素は組織の血管内に好中球を集積させることが判明した。次に、炎症時に遊離されるケモカインとして IL-8 があり、好中球の遊走、そして、接着の活性化に重要な因子であることが知られている。そこで、 α 毒素による好中球の活性化に IL-8 が関与するかを検討した。マウスにおいてヒト IL-8 のホモログとして知られる(43)マウス GRO、及び、マウス KC を指標として検討したところ、 α 毒素投与によりマウス血清中 GRO/KC 濃度を上昇させ、さらに、本毒素による肺組織中への好中球集積は、抗 GRO/KC 抗体の投与で抑制された。以上より、 α 毒素による好中球集積に GRO/KC が関与することが明らかとなった。すなわち、本毒素は、IL-8 の遊離を亢進し、好中球の集積を惹起すると推察された。Kunkel ら(55)は、肺組織では主に、上皮細胞や内皮細胞などから IL-8 が遊離し、炎症時では、IL-8 の過剰な遊離が好中球を異常に活性化させ、重症化に繋がると報告している。そこで、 α 毒素による IL-8 遊離についてヒト肺腺癌由来の上皮細胞である A549 細胞を用いて検討した。その結果、本毒素は A549 細胞からの IL-8 遊離を促進したが、一方で、酵素活性欠損変異体 (H148G) ではこの作用は示さなかったことより、毒素自身の酵素活性が重要で

あると考えられる。所属する研究室では、 α 毒素が細胞に作用して、チロシンキナーゼ関連受容体である TrkA を活性化することを明らかにしている(31, 34, 35)。そこで、本毒素による A549 細胞からの IL-8 遊離に TrkA が関与を検討すると、 α 毒素は TrkA のリン酸化を誘導した。一方、TrkA 阻害剤や TrkA をノックダウンした細胞では、本毒素による IL-8 遊離が抑制された。また、A549 細胞膜表面では、 α 毒素と TrkA の共局在が認められたが、TrkA をノックダウンした A549 細胞では、 α 毒素の結合が低下した。すなわち、本毒素は、受容体の一つとして TrkA を認識する可能性が示唆された。以上の結果より、 α 毒素は A549 細胞の細胞膜表面に存在する TrkA に作用して、その酵素活性により、IL-8 の遊離を惹起することが判明した。

IL-8 の遊離は、その刺激する物質や因子によって様々な細胞内シグナル伝達経路を介して引き起こされる。例えば、宿主への細菌感染では、しばしば感染細胞から IL-8 を遊離させることが知られており、特に、上皮細胞に感染後、MAPK シグナル伝達系の活性化を介して IL-8 の遊離を誘導する細菌感染例が多数報告されている(56-61)。また、TrkA の下流には、ERK1/2、及び、p38 MAPK 経路の存在が知られている(44-48)。そこで、 α 毒素による IL-8 遊離に MAPK 系が関与するかどうかを検討すると、本毒素は ERK1/2、及び、p38 MAPK のリン酸化を示し、さらに、これらのリン酸化は、TrkA 阻害剤で抑制された。また、 α 毒素による IL-8 遊離は、ERK1/2 阻害剤と p38 MAPK 阻害剤で阻害された。従って、 α 毒素は、TrkA を介してその下流シグナルの ERK1/2 経路、及び、p38 MAPK 経路を活性化し、IL-8 の遊離を惹起すると考えられる。次に、細胞内での IL-8 の発現には転写因子である NF- κ B の活性化が関与しており(51, 62-64)、 α 毒素による IL-8 の遊離における、NF- κ B の役割を検討すると、本毒素は NF- κ B を強くリン酸化し、さらに、NF- κ B 阻害剤で、 α 毒素による IL-8 の遊離が抑制された。Karin ら(65)は、NF- κ B は、活性化により細胞核内に移動して IL-8 遺伝子のプロモーター上の結合領域に結合して、遺伝子転写を誘導すると報告している。本研究において、 α 毒素は NF- κ B の核内移行を強く誘導し、この核内移行に

ERK1/2 が関与し、p38 MAPK は関与しないことが判明した。次に、 α 毒素を処理した A549 細胞での IL-8 mRNA 発現量を測定した。その結果、 α 毒素単独処理で IL-8 mRNA 発現量は著しく増加したのに対し、ERK1/2 阻害剤処理では、IL-8 mRNA の発現量はコントロールレベルまで低下した。また、p38 MAPK 阻害剤処理では、 α 毒素単独処理と比較して IL-8 mRNA 発現量の阻害を示した。以上より、本毒素は ERK1/2 経路を介して NF- κ B の核内移行を誘導し、その後、IL-8 の遊離を惹起することが判明した。一方、p38 MAPK は下流シグナル分子の p38 MAP kinase-activated protein kinase (MK-2) を介して活性化した Tristetraprolin (TTP) が IL-8 mRNA の AU-rich element (ARE) に結合して、IL-8 mRNA の安定化に寄与することが知られている(66, 67)。そこで、 α 毒素であらかじめ細胞を処理し、IL-8 mRNA 発現を誘導させ、その mRNA の安定性について解析すると、p38 MAPK 阻害剤処理で細胞内の IL-8 mRNA の分解が有意に増加した。すなわち、本毒素による p38 MAPK の活性化は、IL-8 mRNA の安定性に関与することが明らかとなった。次に、細胞内での IL-8 のタンパク質発現を観察すると、 α 毒素を処理した細胞では、細胞内 IL-8 タンパク質の発現量が大きく増加した。一方、ERK1/2 阻害剤処理では本毒素による細胞内 IL-8 タンパク質の発現量はコントロールレベルまで低下した。また、p38 MAPK 阻害剤では毒素単独処理と比較して細胞内 IL-8 タンパク質の発現量を有意に阻害した。従って、 α 毒素が作用する細胞膜上の TrkA の下流シグナル伝達系で、ERK1/2 は NF- κ B の核内移行を介して IL-8 の転写を活性化し、そして、発現した IL-8 mRNA の安定化には p38 MAPK を介するシグナル伝達が重要であると考えられる。

以上の結果より、Fig. 15 に示すように、 α 毒素は A549 細胞に結合後、TrkA に作用し、その下流 MAPK シグナルの ERK1/2、そして、p38 MAPK の両シグナル分子の活性化を誘導することが判明した。活性化した ERK1/2 は、IL-8 遺伝子の転写因子である NF- κ B の核内移行を誘導し、IL-8 mRNA の転写を惹起し、IL-8 の生成を誘発することが明らかとなった。一方、活性化した p38 MAPK は MK-2 の活性化により発現した

IL-8 mRNA の安定化に働いていると推察された。同様に、他の細菌感染症の場合、エルシニア菌感染症では ERK1/2、及び、p38 MAPK を活性化し、そして、腸炎ビブリオ菌の感染では、ERK1/2 経路を介する IL-8 の転写活性化、及び、p38 MAPK 経路を介する IL-8 mRNA の安定化が報告されている(54, 68)。すなわち、本毒素は細胞膜上の TrkA に作用後、ERK1/2、及び、p38 MAPK の両経路を活性化して、強力に IL-8 の遊離を促進し、ウエルシュ菌感染の重症化に寄与すると考えられる。

これまで、 α 毒素の受容体の可能性として TrkA が示されたが、TrkA のリガンドとして知られる神経成長因子 (NGF) を用いた検討では、本毒素の結合阻害や IL-8 遊離を抑制しないので、 α 毒素は TrkA 以外の分子を認識していると推察した。近年、クロストリジウム属の細菌が産生するボツリヌス菌 A 型神経毒素(69)、破傷風神経毒素、そして、ディフィシル菌 A 毒素(70)は、細胞膜表面に存在するガングリオシドを特異的に認識して結合すると報告されている。一方、 α 毒素は、上述した毒素に共通して認められるガングリオシド結合モチーフが存在している。そこで、 α 毒素の受容体を探索するため、ガングリオシドに着目した。まず、本毒素とガングリオシドとの関係について検討するため、ガングリオシド生合成阻害剤、または、シアル酸切断酵素を用いて検討したところ、 α 毒素による IL-8 遊離、及び、本毒素の結合が著しく阻害された。すなわち、 α 毒素の結合と作用に、ガングリオシドが関与すると推察された。次に、本毒素が認識するガングリオシドを同定するため、糖鎖固定化アレイを用いて網羅的に解析したところ、 α 毒素は、GM1a に特異的に結合するが、GM1a と同じ構造を有する GT1b、GQ1b、そして、GD1b には結合しないことが判明した。すなわち、本毒素は GM1a のシアル酸の位置、つまり、コンフォメーションを特に認識していると推察される (Fig. 17B)。そこで、 α 毒素と GM1a の結合について詳しく解析するため、あらかじめ BODIPY-GM1a を取り込ませた細胞における毒素の結合を観察した。その結果、 α 毒素処理した細胞膜表面では、GM1a が集合したクラスターが多数観察され、このクラスター形成部位に本毒素は局在していた。以上より、本毒素は、GM1a を特異的に認識して結合し、毒素の結合による刺激により GM1a の細胞膜上での移動を惹起し、毒素

が結合した GM1a のクラスター形成を誘導することが明らかとなった。

生体内において GM1a は、普遍的に発現しており、ノックアウトマウスを用いた解析により、生体内におけるその機能が徐々に解明されつつある(79-82)。一方、 α 毒素の生体における作用と GM1a の関係は不明である。そこで、GM1a を含むガングリオシドが欠損した GalNAcT^{-/-}マウス(GM1a 欠損モデル)と GM1a 以外の数種のガングリオシドが欠損した ST^{-/-}マウス(コントロールモデル)を用いて、 α 毒素と GM1a との関係について *in vivo* レベルで解析した。その結果、GalNAcT^{-/-}マウスでは、ST^{-/-}マウスと比較して、本毒素による致死時間の遅延が認められた。さらに、各ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージを用いて毒素との結合を検討すると、GalNAcT^{-/-}由来マクロファージでは、ST^{-/-}由来マクロファージと比較して本毒素との結合がほとんど認められなかった。以上の結果より、生体内において、 α 毒素は、GM1a を特異的に認識して結合し、本毒素の毒性発現には、GM1a が非常に重要な役割を演じていることが示唆された。

ボツリヌス神経毒素と破傷風神経毒素のアミノ酸配列から、ガングリオシド結合サイト、すなわち、H...SxWY...G ペプチドモチーフの存在が報告された(88-91)。一方、Clark ら(84)は、 α 毒素のループ領域(72-93 残基)が細胞膜への結合に関与する可能性を報告した。そこで、シーケンス解析により、本毒素とボツリヌス神経毒素、及び、破傷風神経毒素のアミノ酸配列を比較し、 α 毒素分子内にガングリオシド結合モチーフ(H...SxWY...G)が存在を確認すると、 α 毒素分子のループ領域内に、ガングリオシド結合モチーフが存在することが判明した。一方、ガングリオシドとボツリヌス神経毒素、及び、破傷風神経毒素の結合に、ガングリオシド結合モチーフ内の Trp 残基と Tyr 残基が関与すると報告されている(85, 86)。そこで、 α 毒素分子のガングリオシド結合モチーフ内の Trp 残基と Tyr 残基、そして、その周辺のアミノ酸をそれぞれアラニンで置換した毒素変異体を作製して検討したところ、W84A と Y85A は、IL-8 遊離、細胞への結合、そして、TrkA のリン酸化を示さなかった。さらに、W84A と Y85A は、TrkA のリン酸化を誘導しなかった。次に、これらの残基が GM1a との結合にどのような役割を演じているのか解明するため、 α 毒素と GM1a との結合親和性について、GM1a リポソ-

ムを作製し、SPR 解析を行った。GM1a リポソームに対する結合親和性は、野生型毒素と比較して W84A と Y85A で低下していた。以上より、本毒素のループ領域の 84 位の Trp 残基と 85 位の Tyr 残基が細胞への結合に関与することが判明した。そこで、 α 毒素のループ領域内の W84、及び、Y85 と GM1a の糖鎖構造から MOE を用いて本毒素と GM1a のドッキングシミュレーション解析を行った。 α 毒素ループ領域内の W84 と Y85 が、GM1a 構造中に存在するシアル酸およびガラクトサミンに、それぞれ水素結合、または、シアル酸糖環とスタッキング相互作用することにより、 α 毒素と GM1a が非常に安定した結合構造をとることが推察された。以上の結果より、Fig. 24 に示すように、 α 毒素分子のループ領域内に存在する 84 位の Trp 残基と 85 位の Tyr 残基が GM1a を特異的に認識して結合し、本毒素による刺激により GM1a と α 毒素複合体のクラスター形成を誘導することが判明した。すなわち、 α 毒素の特異的結合受容体として、新たに GM1a の存在を証明した。

これまでより、 α 毒素による IL-8 遊離のメカニズムとして、毒素が GM1a に結合後、細胞膜上で GM1a のクラスター形成が引き金となり、IL-8 遊離を惹起することが明らかになった。しかしながら、本毒素による細胞膜上での GM1a のクラスター形成メカニズムは不明である。 α 毒素は細胞膜のリン脂質成分である、PC、そして、PI を基質として特異的に認識し、PLC 活性により DAG 産生を誘導する(102)。 α 毒素の酵素活性を欠損させた変異体(H148G)では、毒素活性を示さないことから、毒素自身が有する PLC 活性が、細胞膜上でリン脂質を切断することで毒性発現を誘導すると考えられる。そこで、 α 毒素が作用する初期のステップにおいて、毒素自身の PLC 活性が細胞膜上での GM1a のクラスター形成に関与するかどうかを検討した。その結果、 α 毒素は、細胞膜上で GM1a のクラスター形成を引き起こしたが、H148G では認められなかった。また、GM1a の刺激により TrkA が活性化され、両者は脂質ラフトに集積すると報告されている(96)。そこで、TrkA の局在を観察したところ、 α 毒素処理で細胞膜上での TrkA のリン酸化が観察されたが、H148G 処理では認められなかった。すなわち、 α 毒素は GM1a に結合後、本毒素自身の PLC 活性により細胞膜表面のリン脂質を切断し、それ

が引き金となり、おそらく、脂質ラフトで GM1a のクラスター形成と TrkA のリン酸化を誘導すると考えられる。一方、所属する研究室では、本毒素はウサギ好中球に作用して、TrkA を介して内因性 PLC を活性化し、活性酸素産生を惹起することを報告した(34)。さらに、TrkA の下流に存在するシグナル分子として内因性 PLC が報告されている(97)。このことから、 α 毒素による細胞膜上での GM1a クラスター形成と TrkA の活性化に、内因性 PLC が関与すると推察された。そこで、内因性 PLC 阻害剤(U73122)を用いて検討したところ、本毒素による細胞膜上での GM1a クラスター化、及び、IL-8 遊離は、内因性 PLC 阻害剤で抑制された。Ichikawa ら(96)は、GM1a のクラスター化により TrkA が活性化することを報告した。そこで、 α 毒素による細胞膜上での TrkA の活性化に、内因性 PLC が関与するか検討したところ、内因性 PLC 阻害剤処理で、 α 毒素による細胞膜上での TrkA のリン酸化が抑制された。すなわち、本毒素は、一つ目のステップとして、毒素自身の PLC 活性が細胞膜上で DAG を産生し、GM1a のクラスター形成を引き起こし、TrkA を自己リン酸化する。その後、2 つ目のステップとして、リン酸化した TrkA を介して内因性 PLC を活性化し、さらなる DAG 産生を惹起し、過剰に生じた DAG が TrkA を強力にリン酸化を誘導すると考えられる。Obermeier ら(98, 99)は、TrkA は PLC- γ と相互作用することを報告している。そこで、 α 毒素により活性化される内因性 PLC の分子種を同定するために、PLC- γ 1、PLC- γ 2、及び、PLC- β 3 に着目し、これらの抗リン酸化抗体を用いて検討すると、本毒素は、PLC- γ 1 を特異的にリン酸化し、一方、H148G 処理では、いずれのリン酸化も認められなかった。さらに、 α 毒素を処理した細胞では、細胞膜上で多数のリン酸化 PLC- γ 1 の集積が観察され、siRNA で PLC- γ 1 発現をノックダウンした A549 細胞では、本毒素による細胞膜上での GM1a のクラスター形成、及び、IL-8 遊離が阻害された。すなわち、本毒素自身が有する PLC 活性が細胞膜表面のリン脂質を切断し、細胞膜上での GM1a のクラスター形成を促進し、その刺激が TrkA の自己リン酸化を誘導し、TrkA の下流シグナル分子である内因性 PLC- γ 1 が活性化され、DAG が過剰に産生されることにより、IL-8 遊離が惹起される

と考えられる。

これまでの解析結果より、 α 毒素の DAG 産生作用は、IL-8 遊離に関与することを明らかにしているが、DAG の挙動と役割の詳細については不明である。そこで、PKC γ の C1A、及び、C1Bドメインに EYFP がフュージョンしたタンパク(101)をマーカーとして、 α 毒素による DAG の挙動について解析を行った。その結果、細胞内で局在していた EYFP-C1AB は、本毒素処理により細胞膜上へと局在が変化した。すなわち、本毒素は、細胞膜上で急激に DAG を産生していることが判明した。次に、細胞膜外層で産生した DAG は、膜の流動性を変化させ、フリップ-フロップを引き起こすと報告されている(95)。そこで、細胞膜上でのホスファチジルセリン(PS)の露出をフリップ-フロップの指標として検出すると、 α 毒素は、細胞膜上での PS の露出を誘導した。以上より、本毒素処理により細胞膜外層で生じた DAG が膜の流動性に変化を与え、GM1a のクラスター化などの一連の活性化を誘導すると考えられる。

【結論】

α 毒素は、Fig. 32に示すように、A549細胞の細胞膜上に存在するGM1aに特異的に結合後、毒素自身の PLC 活性によって細胞膜外層のリン脂質を切断して DAG を産生する。生じた DAG は、細胞膜の流動性を亢進させ、GM1a のクラスター化を誘導し、その刺激が TrkA の自己リン酸化を引き起こす。活性化された TrkA は、その下流に存在する内因性 PLC- γ 1 を活性化して、細胞膜上でさらなる DAG 産生を亢進させる。その後、細胞膜上で過剰に生じた DAG は、TrkA をより一層強力に活性化し、Fig. 15 に示すように、その下流シグナルの ERK1/2、そして、p38 MAPK の活性化を誘導する。活性化された ERK1/2 は、IL-8 遺伝子の転写因子である NF- κ B の核内移行を促進し、IL-8 mRNA の転写を誘発し、IL-8 の生成、及び、細胞外への遊離を惹起することが明らかとなった。すなわち、ウエルシュ菌の感染による臓器への好中球の集積は、 α 毒素による一連のメカニズムを介して上皮細胞から IL-8 の遊離を強力に誘導することが引き金となることが判明した。

引用文献

1. Sakurai J (1995) *Rev. Med. Microbiol.* 6(3):175-185.
2. McDonel JL (1980) *Pharmacol. Ther.* 10(3):617-655.
3. Nagahama M, Kobayashi K, Ochi S, & Sakurai J (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* 68(1):41-44.
4. 櫻井 純, 永浜 政博, & 越智 定幸 (1994) *日本細菌学雑誌* 49(5, 6):719-736.
5. Duncan CL, Sugiyama H, & Strong DH (1968) *J. Bacteriol.* 95(5):1560-1566.
6. Duncan CL & Strong DH (1969) *Can. J. Microbiol* 15(7):765-770.
7. Duncan CL & Strong DH (1969) *J. Bacteriol.* 100(1):86-94.
8. Flores-Diaz M & Alape-Giron A (2003) *Toxicon* 42(8):979-986.
9. Yamakawa Y & Ohsaka A (1977) *J. Biochem.* 81(1):115-126.
10. Krug EL & Kent C (1984) *Archives of Biochem. Biophys.* 231(2):400-410.
11. Takahashi T, Sugahara T, & Ohsaka A (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 351(1):155-171.
12. Fujii Y, Nomura S, Oshita Y, & Sakurai J (1986) *Br. J. Pharmacol.* 88(3):531-539.
13. Nagahama M, Michiue K, & Sakurai J (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1280(1):120-126.
14. Nagahama M, Otsuka A, Oda M, Singh RK, Ziora ZM, Imagawa H, Nishizawa M, & Sakurai J (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1768(11):2940-2945.
15. Nagahama M, Mukai M, Morimitsu S, Ochi S, & Sakurai J (2002) *Microbiol. Immunol.* 46(10):647-655.

16. Titball RW, Hunter SE, Martin KL, Morris BC, Shuttleworth AD, Rubidge T, Anderson DW, & Kelly DC (1989) *Infect. Immun.* 57(2):367-376.
17. Hough E, Hansen LK, Birknes B, Jynge K, Hansen S, Hordvik A, Little C, Dodson E, & Derewenda Z (1989) *Nature* 338(6213):357-360.
18. Titball RW, Fearn AM, & Williamson ED (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* 110(1):45-50.
19. Nagahama M, Okagawa Y, Nakayama T, Nishioka E, & Sakurai J (1995) *J. Bacteriol.* 177(5):1179-1185.
20. Nagahama M, Nakayama T, Michiue K, & Sakurai J (1997) *Infect. Immun.* 65(8):3489-3492.
21. Sakurai J, Nagahama M, & Ochi S (1997) *J. Toxicol.* 16(4):195-214.
22. Naylor CE, Eaton JT, Howells A, Justin N, Moss DS, Titball RW, & Basak AK (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5(8):738-746.
23. Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, & Hayashi H (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(2):996-1001.
24. Ohsaka A, Tsuchiya M, Oshio C, Miyairi M, Suzuki K, & Yamakawa Y (1978) *Toxicon* 16(4):333-341.
25. Bryant AE, Bayer CR, Aldape MJ, Wallace RJ, Titball RW, & Stevens DL (2006) *J. Med. Microbiol.* 55(Pt 5):495-504.
26. Fujii Y & Sakurai J (1989) *Br. J. Pharmacol.* 97(1):119-124.
27. Sakurai J, Ochi S, & Tanaka H (1993) *Infect. Immun.* 61(9):3711-3718.
28. Ochi S, Hashimoto K, Nagahama M, & Sakurai J (1996) *Infect. Immun.* 64(9):3930-3933.

29. Sakurai J, Ochi S, & Tanaka H (1994) *Infect. Immun.* 62(2):717-721.
30. Ochi S, Oda M, Matsuda H, Ikari S, & Sakurai J (2004) *J. Biol. Chem.* 279(13):12181-12189.
31. Oda M, Matsuno T, Shiihara R, Ochi S, Yamauchi R, Saito Y, Imagawa H, Nagahama M, Nishizawa M, & Sakurai J (2008) *J. Lipid Res.* 49(5):1039-1047.
32. Patriarca P, Cramer R, Marussi M, Moncalvo S, & Rossi F (1971) *J. Reticuloendothel. Soc.* 10(3):251-268.
33. Habermann E (1960) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 238:502-524.
34. Oda M, Ikari S, Matsuno T, Morimune Y, Nagahama M, & Sakurai J (2006) *Infect. Immun.* 74(5):2876-2886.
35. Oda M, Saito Y, Morimune Y, Nagahama M, & Sakurai J (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411(2):241-246.
36. Oda M, Kihara A, Yoshioka H, Saito Y, Watanabe N, Uoo K, Higashihara M, Nagahama M, Koide N, Yokochi T, & Sakurai J (2008) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327(3):934-940.
37. Monturiol-Gross L, Flores-Diaz M, Araya-Castillo C, Pineda-Padilla MJ, Clark GC, Titball RW, & Alape-Giron A (2012) *J. Infect. Dis.* 206(8):1218-1226.
38. Monturiol-Gross L, Flores-Diaz M, Campos-Rodriguez D, Mora R, Rodriguez-Vega M, Marks DL, & Alape-Giron A (2014) *Cell. Microbiol.* 16(4):535-547.
39. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, & Wood WI (1991) *Science* 253(5025):1278-1280.
40. Lum AF, Green CE, Lee GR, Staunton DE, & Simon SI (2002) *J. Biol. Chem.*

- 277(23):20660-20670.
41. Bryant AE & Stevens DL (1996) *Infect. Immun.* 64(1):358-362.
 42. Konig B, Vasil ML, & Konig W (1997) *J. Med. Microbiol.* 46(6):471-478.
 43. Terkeltaub R, Baird S, Sears P, Santiago R, & Boisvert W (1998) *Arthritis Rheum.* 41(5):900-909.
 44. Mutoh T, Tokuda A, Guroff G, & Fujiki N (1993) *J. Neurochem.* 60(4):1540-1547.
 45. Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, & Landreth GE (2001) *J. Biol. Chem.* 276(21):18169-18177.
 46. Fujioka S, Masuda K, Toguchi M, Ohoka Y, Sakai T, Furuyama T, & Inagaki S (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301(2):304-310.
 47. Watanabe H, Yokozeki T, Yamazaki M, Miyazaki H, Sasaki T, Maehama T, Itoh K, Frohman MA, & Kanaho Y (2004) *J. Biol. Chem.* 279(36):37870-37877.
 48. Yamazaki Y, Horibata Y, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y, & Hashikawa T (2007) *Biochem. J.* 407(1):31-40.
 49. Buchholz KR & Stephens RS (2007) *Infect. Immun.* 75(12):5924-5929.
 50. Moon Y, Yang H, & Lee SH (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362(2):256-262.
 51. Cheon IS, Woo SS, Kang SS, Im J, Yun CH, Chung DK, Park DK, & Han SH (2008) *Mol. Immunol.* 45(6):1665-1673.
 52. Yang HT, Cohen P, & Rousseau S (2008) *Cell. Signal.* 20(2):375-380.
 53. Walsh DE, Greene CM, Carroll TP, Taggart CC, Gallagher PM, O'Neill SJ, & McElvaney NG (2001) *J. Biol. Chem.* 276(38):35494-35499.
 54. Shimohata T, Nakano M, Lian X, Shigeyama T, Iba H, Hamamoto A, Yoshida

- M, Harada N, Yamamoto H, Yamato M, Mawatari K, Tamaki T, Nakaya Y, & Takahashi A (2011) *J. Infect. Dis.* 203(4):537-544.
55. Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, & Strieter RM (1991) *Exp. Lung Res.* 17(1):17-23.
 56. Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, & Galan JE (1997) *J. Immunol.* 159(11):5550-5559.
 57. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, & Kundu M (2002) *Biochem. J.* 368(Pt 1):121-129.
 58. Hisatsune J, Nakayama M, Isomoto H, Kurazono H, Mukaida N, Mukhopadhyay AK, Azuma T, Yamaoka Y, Sap J, Yamasaki E, Yahiro K, Moss J, & Hirayama T (2008) *J. Immunol.* 180(7):5017-5027.
 59. Lindfors K, Koskinen O, Kurppa K, Laurila K, Collin P, Haimila K, Partanen J, Saavalainen P, Maki M, & Kaukinen K (2011) *J. Clin. Immunol.* 31(3):436-442.
 60. Dahan S, Busuttill V, Imbert V, Peyron JF, Rampal P, & Czerucka D (2002) *Infect. Immun.* 70(5):2304-2310.
 61. Semiramoth N, Gleizes A, Turbica I, Sandre C, Gorges R, Kansau I, Servin A, & Chollet-Martin S (2009) *J. Leukoc. Biol.* 85(2):310-321.
 62. Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, & Seyfert HM (2008) *Mol. Immunol.* 45(5):1385-1397.
 63. Kang SS, Woo SS, Im J, Yang JS, Yun CH, Ju HR, Son CG, Moon EY, & Han SH (2007) *Int. Immunopharmacol.* 7(11):1488-1495.
 64. Harimaya A, Koizumi J, Fujii N, & Himi T (2007) *Inter. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 71(9):1465-1470.
 65. Karin M & Ben-Neriah Y (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18:621-663.

66. Bhattacharyya S, Gutti U, Mercado J, Moore C, Pollard HB, & Biswas R (2011) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 300(1):L81-87.
67. Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, & Holtmann H (1999) *EMBO J.* 18(18):4969-4980.
68. Grassl GA, Kracht M, Wiedemann A, Hoffmann E, Aepfelbacher M, von Eichel-Streiber C, Bohn E, & Autenrieth IB (2003) *Cell. Microbiol.* 5(12):957-971.
69. Jin R, Rummel A, Binz T, & Brunger AT (2006) *Nature* 444(7122):1092-1095.
70. Papatheodorou P, Carette JE, Bell GW, Schwan C, Guttenberg G, Brummelkamp TR, & Aktories K (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(39):16422-16427.
71. Holmgren J, Elwing H, Fredman P, Strannegard O, & Svennerholm L (1980) *Adv. Exp. Med. Biol.* 125:453-470.
72. Kitamura M, Iwamori M, & Nagai Y (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 628(3):328-335.
73. Fishman PH & Brady RO (1976) *Science* 194(4268):906-915.
74. Hakomori S (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50:733-764.
75. Hakomori S (1990) *J. Biol. Chem.* 265(31):18713-18716.
76. Puri V, Watanabe R, Dominguez M, Sun X, Wheatley CL, Marks DL, & Pagano RE (1999) *Nat. Cell Biol.* 1(6):386-388.
77. D'Auria L, Fenaux M, Aleksandrowicz P, Van Der Smissen P, Chantrain C, Vermylen C, Vikkula M, Courtoy PJ, & Tyteca D (2013) *J. Lipid Res.* 54(4):1066-1076.
78. Kakio A, Nishimoto SI, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, & Matsuzaki K (2001) *J.*

- Biol. Chem.* 276(27):24985-24990.
79. Kitamura M, Takamiya K, Aizawa S, Furukawa K, & Furukawa K (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1441(1):1-3.
80. Kitamura M, Igimi S, Furukawa K, & Furukawa K (2005) *Biochim. Biophys. Acta* 1741(1-2):1-3.
81. Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, Fukumoto S, Haraguchi M, Takeda N, Fujimura K, Sakae M, Kishikawa M, Shiku H, Furukawa K, & Aizawa S (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(20):10662-10667.
82. Okada M, Itoh Mi M, Haraguchi M, Okajima T, Inoue M, Oishi H, Matsuda Y, Iwamoto T, Kawano T, Fukumoto S, Miyazaki H, Furukawa K, Aizawa S, & Furukawa K (2002) *J. Biol. Chem.* 277(3):1633-1636.
83. Tsukamoto K, Kozai Y, Ihara H, Kohda T, Mukamoto M, Tsuji T, & Kozaki S (2008) *Microb. Pathog.* 44(6):484-493.
84. Clark GC, Briggs DC, Karasawa T, Wang X, Cole AR, Maegawa T, Jayasekera PN, Naylor CE, Miller J, Moss DS, Nakamura S, Basak AK, & Titball RW (2003) *J. Mol. Biol.* 333(4):759-769.
85. Arimitsu H, Tsukamoto K, Ochi S, Sasaki K, Kato M, Taniguchi K, Oguma K, & Tsuji T (2009) *Protein Expr. Purif.* 67(2):96-103.
86. Walker N, Holley J, Naylor CE, Flores-Diaz M, Alape-Giron A, Carter G, Carr FJ, Thelestam M, Keyte M, Moss DS, Basak AK, Miller J, & Titball RW (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* 384(1):24-30.
87. Binz T, Kurazono H, Wille M, Frevert J, Wernars K, & Niemann H (1990) *J. Biol. Chem.* 265(16):9153-9158.

88. Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, & Isaacs NW (2000) *J. Biol. Chem.* 275(12):8889-8894.
89. Fotinou C, Emsley P, Black I, Ando H, Ishida H, Kiso M, Sinha KA, Fairweather NF, & Isaacs NW (2001) *J. Biol. Chem.* 276(34):32274-32281.
90. Rummel A, Bade S, Alves J, Bigalke H, & Binz T (2003) *J. Mol. Biol.* 326(3):835-847.
91. Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, & Binz T (2004) *J. Biol. Chem.* 279(29):30865-30870.
92. Nishizuka Y (1992) *Science* 258(5082):607-614.
93. Carman GM & Han GS (2006) *Trends Biochem. Sci.* 31(12):694-699.
94. Berridge MJ & Irvine RF (1984) *Nature* 312(5992):315-321.
95. Pagano RE & Longmuir KJ (1985) *J. Biol. Chem.* 260(3):1909-1916.
96. Ichikawa N, Iwabuchi K, Kurihara H, Ishii K, Kobayashi T, Sasaki T, Hattori N, Mizuno Y, Hozumi K, Yamada Y, & Arikawa-Hirasawa E (2009) *J. Cell Sci.* 122(Pt 2):289-299.
97. Sofroniew MV, Howe CL, & Mobley WC (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1217-1281.
98. Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, & Ullrich A (1993) *EMBO J.* 12(3):933-941.
99. Obermeier A, Bradshaw RA, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, & Ullrich A (1994) *EMBO J.* 13(7):1585-1590.
100. Oancea E, Teruel MN, Quest AF, & Meyer T (1998) *J. Cell Biol.* 140(3):485-498.
101. Ueda Y, Makino A, Murase-Tamada K, Sakai S, Inaba T, Hullin-Matsuda F, &

Kobayashi T (2013) *FASEB J.* 27(8):3284-3297.

102. Urbina P, Collado MI, Alonso A, Goni FM, Flores-Diaz M, Alape-Giron A, Ruyschaert JM, & Lensink MF (2011) *Biochim. Biophys. Acta* 1808(10):2618-2627.

発表論文

1. 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. ***Biochim. Biophys. Acta.*** 1822, 1581-1589 (2012)
2. 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)
3. **Takagishi, T.**, Oda, M., Kabura, M., Kurosawa, M., Tominaga, K., Urano, S., Ueda, Y., Kobayashi, K., Kobayashi, T., Sakurai, J., Terao, Y., Nagahama, M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin induces GM1a clustering and TrkA phosphorylation in the host cell membrane. ***PLoS ONE.*** 10: e0120497 (2015)

謝辞

本論文に関し、終始熱心な御指導、御鞭撻を受け賜りました本学微生物学教室、永浜政博教授に深謝いたします。本研究にご協力頂きました微生物学教室、小林敬子助教、竹原正也助教、並びに、微生物学教室員に感謝いたします。そして、本研究を行うにあたり、多大な御指導と御助言を受け賜りました新潟大学歯学部微生物感染症学分野の小田真隆准教授に深謝いたします。マウス病理組織標本を作製して頂きました本学機能形態学教室の瀬津弘順教授、井上正久教授、阿部友美助教に感謝いたします。ノックアウトマウスを供与して頂きました名古屋大学医学部の古川鋼一先生、また、EYFP-C1AB プラスミドを供与して頂きました理化学研究所の小林俊秀先生、上田善文先生に深謝いたします。