

セレウス菌感染症とスフィンゴミエリナーゼの関係

(微生物学教室) 小田真隆

【目的】

セレウス菌は、芽胞を形成するグラム陽性桿菌で、食中毒の原因菌としてよく知られている。近年、セレウス菌は、病院施設における菌血症のアウトブレイク、さらに、敗血症や髄膜炎の症例も報告され、院内感染症の原因菌として注目されてきた(1-3)。一方、本菌は、エンテロトキシンと嘔吐毒、そして、酵素としてホスフォリパーゼ C とスフィンゴミエリナーゼ (SMase) などを菌体外に遊離するが、壊死、致死、細胞活性などを有する強力な毒素を産生しない。一方、SMase 産生細菌の感染症において、これら細菌の宿主防御機構からのエスケープに SMase が役割を演じていると報告されていること、さらに、SMase が関与するスフィンゴミエリ (SM) 代謝系は、細胞内シグナル伝達系の重要な経路のひとつであること、特に、セラミド、スフィンゴシンは、アポトーシスシグナルに関与していることが知られている。そこで今回、セレウス菌感染症に対するセレウス菌 SMase (*Bc*-SMase) の影響について解析した。

【結果】

セレウス菌感染における *Bc*-SMase の役割を解明するため、 1×10^9 cells/mouse のセレウス菌と種々の濃度の *Bc*-SMase をマウス腹腔内へ同時投与し、18 時間後観察した。その結果、セレウス菌単独投与群では、腹腔、及び、血中に菌の存在は確認できなかったが、*Bc*-SMase (5 μ g/mouse) との共存投与群では、腹腔、及び、血中に多くの菌が検出された (Fig. 1A)。さらに、*Bc*-SMase (5 μ g/mouse) との共存投与群の血中内サイトカイン量を測定した結果、TNF- α 、IL-1 β の著しい増加が認められ (Fig. 1B, 1C)、この条件下のマウスは、24 時間以内に死亡した (Fig. 1D)。

SMase 高発現セレウス菌 (1×10^8 cfu/ml) をマウス腹腔内に投与し、24 時間後の腹腔、及び、血中内菌数を測定した。その結果、wild-type セレウス菌の *in vivo* における感染拡大は観察されなかったが、SMase 高発現菌を投与したマウスでは、腹腔、及び、血中に菌が認められた (Fig. 2A)。また、*Bc*-SMase 高発現枯草菌でも同様の結果が認められた (Fig. 2B)。

菌の感染拡大に *Bc*-SMase が密接に関与することが判明したため、感染初期に重要な役割を演ずるマクロファージに対する *Bc*-SMase の影響を解析した。マウス腹腔マクロファージを種々の濃度の *Bc*-SMase で、37 $^{\circ}$ C、1 時間処理インキュベーション後、5 μ g/ml のペプチドグリカン (PGN) を添加し、37 $^{\circ}$ C、1 時間後の細胞内 H₂O₂ 産生量を測定した。その結果、PGN による活性酸素産生作用は、*Bc*-SMase 処理の濃度に依存して抑制された。さらに、マウス腹腔マクロファージの貪食能に対する *Bc*-SMase の影響について検討した結果、PGN によるマクロファージの貪食能亢進作用は、*Bc*-SMase の濃度に依存して低下した。一方、*Bc*-SMase は、PGN によるマクロファージからの TNF α 遊離に対してほとんど影響を示さなかった。また、本実験条件下では、*Bc*-SMase の細胞毒性は、認められなかった。従って、本酵素は、細胞膜を破壊して作用を発現していないことが明らかとなった。

2008 年、Montes らは、共焦点レーザー顕微鏡を用い、細胞膜内のセラミドクラスター形成像の撮影に成功し、示差走査熱量系を用い、セラミドクラスターを形成した細胞膜は、細胞膜の流動性が減少していると報告している (4)。そこで、マウス腹腔マクロファージと *Bc*-SMase を 37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベーションし、BODIPY C12-sphingomyelin で染色後、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、コントロール細胞で

は、SM、および、セラミドが細胞膜上にほぼ均一に分布している像が認められたが、*Bc-SMase* 処理した細胞では、その分布は不均一で、局在していることが判明した (Fig. 3)。従って、*Bc-SMase* 処理により細胞膜上でのセラミドクラスターの形成亢進が判明した。

Bc-SMase 処理により細胞膜内でセラミドクラスターが形成することから、細胞膜内で集積しているセラミド分子種について分析した。マウス腹腔マクロファージに種々の濃度の *Bc-SMase* を添加後、37°C、1 時間インキュベーションし、生成亢進したセラミド分子種量を測定した結果、C16:0 セラミド、及び、C24:1 セラミドが特異的に増加していることが明らかとなった。そこで、この 2 種類のセラミドのマクロファージに対する影響について解析した。マウス腹腔マクロファージを 50 µM の C16:0-ceramide、及び、C24:1-ceramide で 37°C、1 時間前処理後、PGN を添加し、37°C、30 分間インキュベーションした。その結果、PGN によるマクロファージ貪食能、及び、H₂O₂ 産生亢進作用は、これらのセラミドによって抑制されることが判明した (Fig. 4)。

【考察】

黄色ブドウ球菌、レプトスピラ、炭疽菌、リステリア菌は、SMase を産生し、これらの SMase と *Bc-SMase* のアミノ酸配列は、約 75% の相同性を示す。これらの細菌由来 SMase は、いずれも、酵素内にセントラルサイト、β ヘアピン構造、及び、サイドエッジ領域を有しているなど三次元構造も類似している (5, 6)。黄色ブドウ球菌の場合、SMase は、貪食細胞に対する作用、さらに、本酵素は、炭疽菌の場合、感染症拡大、リステリア菌の場合、感染後、*in vivo* におけるエスケープに関与していることが報告されているが、SMase は、細胞毒性、致死毒性を有していないこともあり、その機構に関しては、全くブラックボックスであった。今回の解析により、*Bc-SMase* がマクロファージに作用すると、細胞膜において C16:0-、C24:1-セラミドが蓄積していること、さらに、生成亢進したセラミドがクラスターを形成していることが判明した。また、セラミドクラスター形成により、細胞膜の流動性が低下することが報告されていることから (4)、*Bc-SMase* による細胞膜中での SM からのセラミド生成が膜流動性の低下を引き起こし、貪食機能、及び、活性酸素産生作用の低下を導いていると推察される。従って、細菌由来 SMase は、特異的に、食細胞の貪食能、活性酸素産生能を抑えることにより、細菌の *in vivo* における宿主内でのエスケープに重要な役割を演ずる病原因子と推察される (Fig. 5)。近年、セレウス菌、黄色ブドウ球菌、そして、リステリア菌は、複合感染により敗血症を引き起こすことが報告されており、*Bc-SMase* の免疫系細胞に対する作用解明は、これらの感染症発症の解明にも繋がると考える。

【参考文献】

1. Hilliard, N. J., Schelonka, R. L., and Waites, K. B. (2003) *J Clin Microbiol* **41**, 3441-3444
2. Frankard, J., Li, R., Taccone, F., Struelens, M. J., Jacobs, F., and Kentos, A. (2004) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**, 725-728
3. Le Scannff, J., Mohammedi, I., Thiebaut, A., Martin, O., Argaud, L., and Robert, D. (2006) *Infection* **34**, 98-99
4. Montes, L. R., Lopez, D. J., Sot, J., Bagatolli, L. A., Stonehouse, M. J., Vasil, M. L., Wu, B. X., Hannun Y. A., Goni, F. M., and Alonso, A. (2008) *Biochemistry* **47**, 11222-11230
5. Ago, H., Oda, M., Takahashi, M., Tsuge, H., Ochi, S., Katunuma, N., Miyano, M., and Sakurai, J. (2006) *J Biol Chem* **281**, 16157-16167
6. Openshaw, A. E., Race, P. R., Monzo, H. J., Vazquez-Boland, J. A., and Banfield, M. J. (2005) *J Biol Chem* **280**, 35011-35017

【Figures】

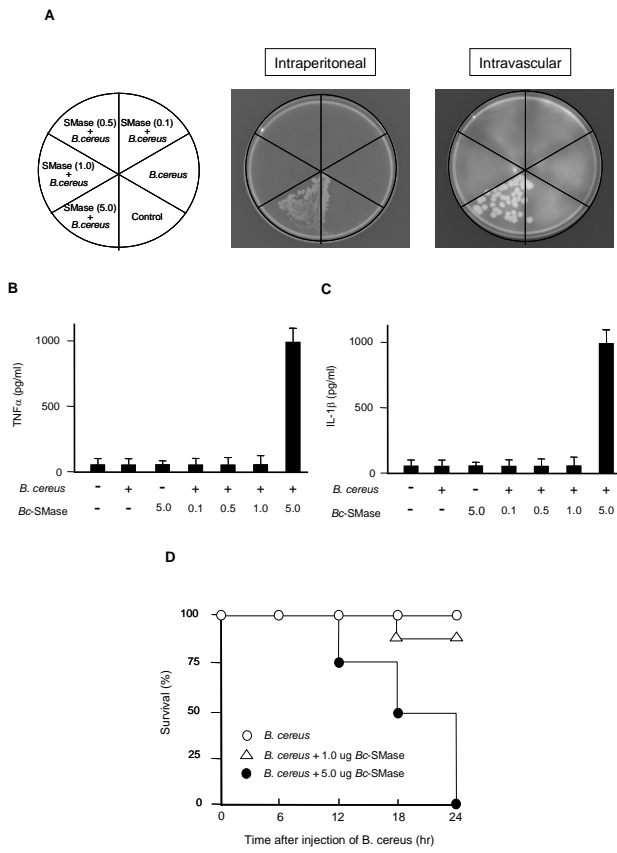


Fig. 1 Effect of *Bc*-SMase on the infection of *B. cereus*.

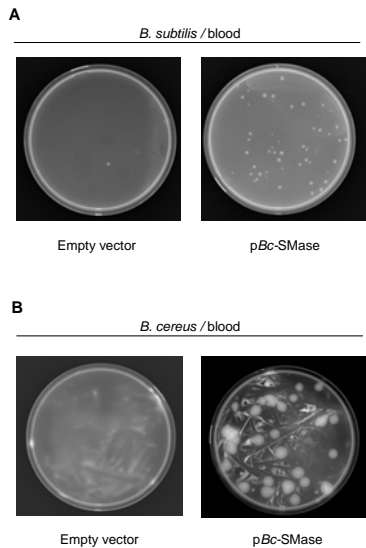


Fig. 2 The infection of *B. subtilis* and *B. cereus* with high expression of SMase gene.

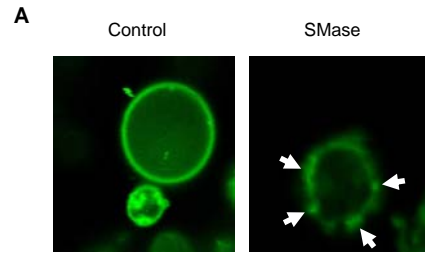


Fig. 3 Confocal fluorescence microscopy images of mouse macrophages treated with *Bc*-SMase

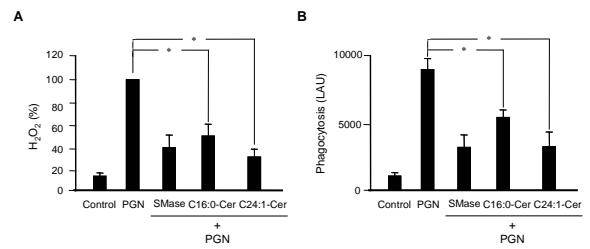


Fig. 4 Effect of ceramides on activation of macrophage induced by PGN

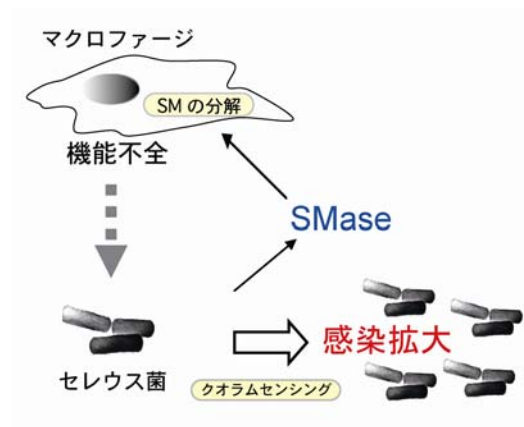


Fig. 5 The role of *Bc*-SMase on propagation of *B. cereus*.