

博 士 論 文

C型ウエルシュ菌 β 毒素の毒性メカニズムの
解析

徳島文理大学大学院薬学研究科

薬学専攻 博士課程

清 家 総 史

指導教授 永浜政博

平成二十九年提出

C型ウエルシュ菌β毒素の毒性メカニズムの解析

目次

略語一覧	3
緒論	5
第一章 ウエルシュ菌 β 毒素のレセプター探索	22
第一節 β 毒素の細胞毒性と P2X レセプターの探索	23
第二節 β 毒素と P2X ₇ レセプターの相互作用	39
第三節 β 毒素のマウス致死作用における P2X ₇ レセプターの役割	47
第四節 考察および小括	49
第二章 ウエルシュ菌 β 毒素の細胞毒性に関するシグナルの解明	59
第一節 β 毒素の細胞毒性と Pannexin1 シグナルの関係	60
第二節 β 毒素の細胞内 ATP 遊離作用	66
第三節 β 毒素の細胞毒性における細胞外 ATP の役割	73
第四節 考察および小括	77
第三章 ウエルシュ菌 β 毒素の細胞毒性における p38 MAPK の役割	85
第一節 β 毒素の細胞内 K ⁺ 遊離作用	86
第二節 β 毒素の細胞毒性と MAPK シグナルの関係	88
第三節 β 毒素の細胞毒性における細胞外 K ⁺ の役割	93
第四節 考察および小括	97

第四章 総括および結論	105
引用文献	113
発表論文	127
謝辞	128

略 語 一 覧

ATPR:	ATP receptor
BBG:	Brilliant blue G
β -PFT:	β -pore-forming toxin
CBX:	Carbenoxolone
CF:	5-Carboxyfluorescein diacetate
Chol:	Cholesterol
DCF:	2', 7'-dichlorofluorescein
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DOPC:	1, 2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-choline
Fura 2-AM:	Fura 2-asetoxymethyl ester
GM2:	Monosialotetrahexosyl ganglioside ₂
GST:	Glutathione S-transferase
HRP:	Horseradish peroxidase
IBD:	Inflammatory bowel disease
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
LPS:	Lipopolysaccharide
MAPK:	Mitogen-activated Protein Kinase
MTS:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NAC:	N-acetyl cysteine
Panx1:	Pannexin1
Pb:	Probenecid
PPADS:	Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonic acid
P2R:	P2 receptor
P2XR:	P2X receptor

P2X₇R: P2X₇ receptor
 PVDF: PolyVinylidene DiFluoride
 ROS: Reactive oxygen species

アミノ酸の略号

A	Ala	Alanine	M	Met	Methionine
C	Cys	Cysteine	N	Asp	Asparagine
D	Asp	Aspartic acid	P	Pro	Proline
E	Glu	Glutamic acid	Q	Gln	Glutamine
F	Phe	Phenylalanine	R	Arg	Arginine
G	Gly	Glycine	S	Ser	Serine
H	His	Histidine	T	Thr	Threonine
I	Ile	Isoleucine	V	Val	Valine
K	Lys	Lysine	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucine	Y	Tyr	Tyrosine

緒 論

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、土壌や動物の腸管内等、自然界に広く分布している。本菌はクロストリジウム属の中で比較的嫌気要求度の低い偏性嫌気性桿菌で、嫌気度が高くない培地でもある程度の増殖が可能である。さらに、本菌は、他の病原性クロストリジウム属の細菌と異なり、鞭毛を有さず運動性を示さない。ウエルシュ菌は芽胞形成菌で、栄養素が制限された特殊な培地 (Duncan-Strong 芽胞形成培地) 中で効率よく芽胞を形成するが、通常培地中ではほとんど芽胞を形成しない。本菌は、増殖時に多くのタンパク毒素を菌体外に産生する。Table 1 に示す 4 種の主要毒素である α 毒素、 β 毒素、 ϵ 毒素、 i 毒素を産生し、それぞれの毒素は異なる生物活性を示す (1-4)。ウエルシュ菌は、これら 4 種の毒素の産生能により、A~E の 5 型に分類され (Table 1)、それぞれが異なる病原性を示す。

C 型ウエルシュ菌による壊疽性腸炎は、第二次世界大戦後、Darmbrand と呼ばれ、北ドイツやスカンジナビアで最初に報告された。この感染症は、激しい腹痛やショックを伴い、子供や大人に出血性の腸炎を引き起こす致死性の高い疾患であった。Darmbrand は、長期間の低タンパク食物を摂取していた人が高タンパク食の肉の缶詰を大量に摂取することで、小腸の蠕動運動が低下し、食物と共に摂取した C 型菌が小腸で増殖して発症すると報告された。その後、ウガンダ (5, 6)、オーストラリア (7)、アメリカ合衆国 (8)、パプアニューギニア (9)、タイ (10) など、世界各地で C 型ウエルシュ菌による壊疽性腸炎が報告されてきた。1963 年には、パプアニューギニア北部で発生した C 型菌感染症による Pig-bel と呼ばれる風土病が報告された。Pig-bel においても、日常で低タンパク性の食物 (主食・タロイモ) を摂食していた人が、この地方の祭りで豚肉などの高カロリー動物性タンパク質を大量摂取したことが原因で、腸管内で C 型菌が増殖し、激しい腹痛、出血性下痢、嘔吐や腸閉塞症状を示した。また、所属する研究室とタイの研究機関は、1987 年に共同でタイとカンボジア国境付近のクメールキャンプで発熱、出血性下痢を伴う C 型ウエルシュ菌による壊疽性腸炎を報告した (10)。その後も、散発的に各国で本菌感染症が認められている。壊疽性腸炎の特徴は、腸粘膜の剥離、炎症や出血、そして、35~40%の高い致

死率を示すことである。すなわち、経口的に侵入した本菌は小腸上部で増殖し、大量の β 毒素を産生し、その結果、本毒素の障害作用により、小腸上部（空腸）で潰瘍や炎症を伴う急性腸炎が引き起こされ、激しい出血を伴う下痢と、急激な虚脱状態を呈して死に至ると考えられている。従って、本感染症の発症に、宿主側の抵抗力や生理現象が深く関わっていると考えられている。日本では、これまで C 型菌によるヒトの症例は報告がなかったが、所属する研究室では、2007 年に北海道大学との共同研究で、糖尿病を発症した 50 歳代男性において、C 型菌による壊疽性腸炎を報告した (11)。一方で、C 型菌はヒト以外でもブタ、子ウシ、ニワトリ等の家畜において同様の感染症を示す。日本においても、家畜のブタで C 型菌による壊疽性腸炎が報告されている (12)。また、2016 年、タイで下痢を起こしたブタの糞便から多剤耐性ウエルシュ菌が単離され、本菌感染症に対する抗生物質の使用法も問題視されている (13)。

本感染症の疫学調査において、 β 毒素を産生する C 型ウエルシュ菌が Pig-bel の壊疽性腸炎患者から単離されたこと、その患者の血清中の抗 β 毒素抗体価が、その地方の非感染者の場合と比較すると非常に高いこと、そして、本感染症の死亡者は、抗 β 毒素抗体価の低い 10 歳以下の子どもに多いことなどから、 β 毒素が C 型菌感染症において主要な病原因子であることが報告された (14)。さらに、患者から単離した C 型菌を子ブタやモルモットに感染させると、本感染症が再現された (15)。また、2007 年の報告では、壊疽性腸炎患者の腸管病理組織標本を観察すると、腸管の壊疽組織中に β 毒素が検出された (11)。本毒素と疾患に関して、2006 年に Fisher は、C 型菌の培養上清には、 α 毒素、 β 毒素、パーフリンゴシン O、および、 β 2 毒素が存在し、その上清をマウスに尾静脈内投与したとき、 β 毒素のみがマウスの致死に関与していることを報告した (16)。また、Sayeed らは、C 型ウエルシュ菌 CN3675 株の対数増殖期の培養上清が、ウサギ回腸で壊疽性腸炎を誘発することを報告した (17)。さらに、彼らは、同菌株で α 毒素とパーフリンゴシン O の遺伝子を削除した変異株が回腸で同様の病原性を示すのに対し、 β 毒素遺伝子を削除した菌株は、病原性が減弱することを報告した (17)。さらに、2007 年に Fernandez-Miyakawa らは、B 型菌の培養上清をマウスの静脈内に投与すると、C 型菌感染症と同様の症状を示すこと、および、

β毒素に対するモノクローナル抗体と培地上清をインキュベーションした後、静脈内投与すると致死が抑制されることから、培養上清中のβ毒素がマウスの致死に関与する主要な因子であると報告した (18)。以上の知見から、β毒素が、本菌による壊疽性腸炎の主要な起病因子として考えられてきた (19, 20)。2007年に、日本で、ブタの壊疽性腸炎から単離されたC型菌は、β毒素以外に、新規に発見されたTpeLと命名された毒素を多量に産生し、本菌の病原性と深く関与することが報告された (12, 21)。TpeLは細胞毒性を示し、低分子Gタンパク質をグルコシル化することが報告され (22, 23)、今後、C型菌感染症におけるTpeLの役割やβ毒素との関連性も注目されている。

C型ウエルシュ菌による壊疽性腸炎の予防には、パプアニューギニアで、C型菌培養上清の粗毒素標品のβ毒素をホルマリンで無毒化したβトキシイドを接種した人において、本感染症に対する予防効果を示すことが報告された。しかしながら、βトキシイドは不安定で均一な標品が得られず、このワクチンを工業的に大量生産することは困難であった。2006年に、Nijlandらは、遺伝子操作によって、β毒素の1個のアミノ酸を置換し毒性を示さない変異体毒素を枯草菌 (*Bacillus subtilis*) で発現させたが、性状が不安定で免疫効果がほとんど認められなかった (24)。その後、Nijlandらは免疫原性を有し、毒性のないトキシイドを効率よく得るため、広い宿主スペクトルを有するマルチコピープラスミドに *B. subtilis* 由来の高発現 *rpsF* プロモーターを組み込み、この下流に変異β毒素遺伝子を挿入して *B. subtilis* でβ変異毒素の発現を試みた。その結果、本トキシイドは菌体内に高濃度に蓄積され、菌体外にはわずかにしか分泌されず、大量精製は困難であった。そこで、このベクターを *Lactococcus lactis*、または、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) にトランスフォームして発現させると、この変異毒素は、*B. subtilis* と比較して約10倍量が菌体外に分泌されると報告したが、不安定であった (25)。以上のように、遺伝子組換えβトキシイドを安定して大量に供給する方法は、未だ確立されず、本菌感染症克服のため変異β毒素の大量産生法の確立が必要とされている。

β毒素は、易熱性で、タンパク分解酵素に非常に弱く不安定な毒素である (26)。従って、本毒素の精製は困難であったが、Sakurai と Duncan は、C型菌の毒素産生に

最適な毒素産生培地を考案した。さらに、C型菌培養時に培地のpHが酸性に傾くと毒素産生が低下することを見出し、培地のpHを中性付近に維持し培養するpH制御培養法を確立し、さらに、ゲルろ過、等電点電気泳動、そして、抗体アフィニティークロマトグラフィーを用いてβ毒素の精製法を最初に報告した(27)。しかしながら、この方法は精製過程が複雑で、精製毒素が少量しか得られず、毒素を多量に得ることは困難であった。その後、SakuraiとFujiiは、大量の精製毒素が得られる改良法を報告した(28)。pH制御培養法でC型菌をpH 7.5の条件下、定常期まで培養し、その培養上清を50%硫酸アンモニウムで分画後、Zn²⁺-金属アフィニティークロマトグラフィーにβ毒素を吸着させ、ヒスチジン溶液で溶出し、その標品をToyopearl HW60カラムを用いてβ毒素を精製した。Toyopearl HW60は、ゲル濾過カラムであるが、β毒素はこの担体と弱く相互作用し、低分子量物質が溶出した後に溶出され、均一な毒素標品が得られた。この方法で、β毒素は精製ステップを短縮でき、容易に大量精製が可能となった。精製したβ毒素は急速に失活するが、SakuraiとFujiiは、この不活性な毒素標品をSDS-PAGEで分析すると、SDSで処理しても解離しないβ毒素の会合体(オリゴマー)が認められたことを報告した(28)。すなわち、毒素保存時の急激な活性の消失は、毒素分子のオリゴマー化によるものであると報告した(28)。所属する研究室では、β毒素精製標品からN末端側のアミノ酸配列を決定し、他の研究グループと共同で、そのデータに基づき、B型菌からβ毒素遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。この配列より、β毒素の推定アミノ酸配列が判明し、Table 2に示すような309残基からなる分子量34,681のタンパク毒素であることが明らかになった(29)。Steinthorsdottirらは、組換えβ毒素を得るため、β毒素遺伝子をpGEX-3Xベクターのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子の下流に挿入し、大腸菌(*Escherichia coli*) UT5600株でGST-β毒素フュージョンタンパク質を発現させた。プロテアーゼでGSTを切断後、活性を有するβ毒素が得られなかった(30)。さらに、Steinthorsdottirらは、β毒素遺伝子を*E. coli*-*B. subtilis*シャトルベクターに挿入し、*B. subtilis*で組換えβ毒素の発現を行ったが、この方法でも本毒素は不安定のため、精製できなかった(30)。その後、所属する研究室では、β毒素遺伝子を用いて、下記の方法で、*E. coli*で活性を有する組換えβ毒素の精製に初めて成功した(31)。

Hunter らの報告 (24) から、 β 毒素遺伝子を B 型菌から PCR 法で増幅し、pGEX-4T-1 ベクターの GST 遺伝子下流に挿入した。その後、*E. coli* BL21 株にトランスフォームし、GST- β 毒素フュージョンタンパク質の形で発現させ、グルタチオンセファロース 4B カラムで部分精製した。次に、GST- β 毒素フュージョンタンパク質をトロンビンで処理し、GST と β 毒素を切断後、グルタチオンセファロース 4B カラムとハイドロキシアパタイトカラムを用い、精製 β 毒素標品を得た。精製組換え β 毒素は、ウエルシュ菌から精製した Native β 毒素とウサギ抗 β 毒素血清を使用したオクタロニー法で Fuse し、さらに、同程度のマウス致死活性と細胞毒性を示し、Native β 毒素と同様の性質を有すると報告した (31)。

Sakurai ら (32, 33) は、 β 毒素の致死と壊死活性は、種々の酸化剤や SH 修飾剤の処理により消失すること、また、これら修飾剤により消失した毒素活性は、DTT などの還元剤処理で回復すること、さらに、分子内の SH 基を調べると、毒素分子内に 1 個のシステイン (Cys) 残基が存在し、この残基が毒素活性に重要であると報告した。その後、 β 毒素の遺伝子配列から、Nagahama (31) らは、本毒素分子内に唯一存在する 265 位 Cys 残基を部位特異的変異法により、SH 基を有さない種々のアミノ酸残基に置換した。その結果、小さな側鎖を有するアラニン (Ala) やセリン (Ser) に置換した変異毒素の場合は、Wild-type と同程度の致死活性が認められた。一方、大きな側鎖を有するヒスチジン (His) やチロシン (Tyr) へ置換した変異毒素の場合は、本毒素活性が著しく減少した。この Cys 残基は、アミノ酸配列より、親水性領域と疎水性領域の境界に存在している可能性が推察された。従って、265 位 Cys 残基は、活性中心には存在しないが、この残基に大きな側鎖のアミノ酸が導入されることで、活性部位の入り口がふさがれ、立体障害 (Steric hindrance) が生じ、活性が減少すると推察される。以上より、Nagahama らはこの Cys 残基は、活性発現に重要な領域の近傍に存在すると報告した (31)。そこで、 β 毒素の活性部位を特定するため、Nagahama らは、 β 毒素分子中の 265 位 Cys 残基周辺の 266 位 Tyr、268 位 ロイシン (Leu)、275 位 トリプトファン (Trp) 残基のアミノ酸置換を行った (Fig. 1) (31)。その結果、これら変異毒素は毒素活性が著しく低下し、これら残基が活性発現に重要であることが判明した。さらに、275 位 Trp 残基を Ala に置換した W275A

は、前投与によりβ毒素のマウス致死活性を抑制した。一方で、266位 Tyr と 268位 Leu 残基を Ala に置換した変異体 (Y266A, L268A) は、いずれも抑制作用を示さなかった。すなわち、W275A は、Wild-type 毒素のレセプターへの結合を抑制すると考えられ、Y266A、L268A は結合部位が変化して抑制を示さないと考えられる。以上から、β毒素の 275位 Trp 残基は毒素の作用に、266位 Tyr と 268位 Leu 残基はレセプターへの結合に関与する可能性を報告した (31)。従って、β毒素分子内で唯一存在する Cys 残基付近の領域は、毒素の結合、あるいは、作用に関与する可能性が示唆された。

Hunter らは、β毒素の推定アミノ酸配列を他のタンパク質と比較すると、特に、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) が産生する毒素と相同性が高く (Table 3)、*S. aureus* α-toxin とは 28%、γ-toxin の A、および、B 成分とは 22 と 28%、Leukocidin の S と F 成分とは 17 と 28%の相同性を示した (29)。さらに、ウエルシュ菌が産生するδ毒素とは 43%、そして、NetB とは 40%の相同性を示すことが明らかになった (34, 35)。α-toxin は、赤血球などの標的細胞の細胞膜にモノマーで結合後、細胞膜上で 7 分子のオリゴマーとなり、細胞膜にポアを形成して細胞毒性を示す (36)。さらに、γ-toxin や Leukocidin、そして、ウエルシュ菌δ毒素や NetB も同様に感受性細胞膜上でオリゴマーを形成する。これらの毒素ファミリー (β-pore-forming toxin: β-PFT) の中で、α-toxin やウエルシュ菌δ毒素や NetB はホモオリゴマーを形成し、一方、γ-toxin や Leukocidin はヘテロオリゴマーを形成する。いずれの場合もオリゴマー化することにより、膜貫通ポアを形成して、細胞毒性を示す (37)。Walker と Bayley は、α-toxin の 200位アルギニン (Arg) の置換は、溶血活性が減少すると報告し (38)、Steinhorsdottir は、β毒素分子中でα-toxin の 200位 Arg に相当する 212位 Arg を置換すると、致死活性が有意に減少すると報告した (39)。また、ウエルシュ菌δ毒素や NetB においても、200位に相当する Arg は保存され、NetB では 200位 Arg のグルタミン (Gln) への置換により、細胞毒性や、細胞への結合が減少することが報告されている (40)。以上より、この Arg 残基はβ-PFT に共通して重要な残基であることが判明した。Sakurai と Nagahama は、Fig. 1 に示すように、β毒素と *S. aureus* α-toxin の構造との関連性から、α-toxin 分子内に存在する活性に重要な

リム、トライアングル、そして、ステム領域に相当する領域が β 毒素にも存在し、これらが重要であると推察した。 α -toxin のリムドメイン (膜結合ドメイン) に相当する β 毒素の 193-212 残基の削除、そして、 α -toxin のステムドメイン (膜侵入ドメイン) に相当する β 毒素の 139-150 残基を削除すると、いずれも活性が消失、さらに、トライアングル領域の 165 位 Gln と 167 位アスパラギン酸 (Asp) の置換、ステムドメインの 202 位バリン (Val) と 208 位フェニルアラニン (Phe) の Ala への置換は、活性が大きく減少する結果を得た (41)。これまでの結果から、Tweten は、 β 毒素は、膜破壊作用を示すオリゴマー形成毒素ファミリーに属すると推察した (42)。

β 毒素は、Table 2 に示すように、生物活性として致死、壊死、そして、血圧上昇活性、そして、血球系培養細胞を破壊する細胞毒性などを有している。これまでに β 毒素の *in vivo* における作用については、以下の報告がある。Sakurai と Fujii は、 β 毒素の致死活性発現は、静注、腹腔、経口の順に低下し、精製 β 毒素をマウス尾静脈に投与すると、一定時間内 (投与量に依存する) では、外見上の変化は認められず、その後は外部からの刺激に反応しなくなり、四肢の麻痺、そして、眼球の突出が起こり、最後に痙攣を起こして死に至ると報告した (28)。さらに、 β 毒素による皮膚壊死活性は、モルモットの脱毛背部の皮膚に皮下投与すると、最小投与量は、2 ng/site で壊死を示すと報告している (28)。 β 毒素の皮下投与により、投与部位は初期に皮膚の赤みが消え、白くなることから、皮膚の血行障害、すなわち、血管収縮が引き起こされ、次いで、皮膚組織への栄養、酸素供給不足のため、組織の壊死が誘導されていく可能性が推察された。Sakurai らは、麻酔したラットに β 毒素を投与すると、用量依存的な血圧上昇と心拍数の減少を引き起こすこと、そして、同時に、ラット腸間膜を顕微鏡で観察すると、血圧上昇と同じタイムコースで細動脈が収縮することから、本毒素による血圧上昇は、末梢血管 (細動脈) の収縮による血管抵抗性の増大が原因であると推察した (43)。次に、Sakurai らは、本毒素による血圧上昇機構を明らかにするため、アドレナリン α 受容体阻害薬であるフェノキシベンザミン、あるいは、ノルアドレナリン遊離阻害薬であるグアネチジンを前投与すると、 β 毒素の昇圧作用は抑制された (44)。さらに、ナトリウムチャンネル阻害剤であるテトロドトキシン、あるいは、神経節遮断薬であるヘキサメトニウム処理で、本毒素の昇圧作用は著しく

抑制され、スパイナル（脊髄破壊）ラットにおいては、本毒素の昇圧作用は、ほとんど認められなかった（45）。これらの知見から、 β 毒素は、まず、中枢神経に直接作用し、その刺激が末梢神経に伝達され、神経末端からのカテコールアミンの遊離を促し、その結果、血管平滑筋が収縮し、血圧が上昇すると推察した。次に、Sakurai と Nagahama は、 β 毒素をマウスに腹腔内投与後、病理組織学的変化を観察したところ、腸間膜の著しい膨潤、すなわち、浮腫と脾臓細胞の核濃縮と壊死が認められ、本毒素は、腸間膜の血管透過性を亢進し、腸間膜で包まれた脾臓に障害を与えることも明らかにした（45）。次に、Nagahama らは、 β 毒素によるマウス皮膚血管透過性の亢進作用を検討し（Fig. 2）、 β 毒素による血管透過性亢進は、ヒスタミン H_1 レセプターアンタゴニストであるジフェンヒドラミン、タキキニン NK_1 レセプターアンタゴニストである [D-Pro4, D-Trp7, 9]-SP や Spantide、さらに、神経末端のサブスタンス P (SP) を枯渇させるカプサイシンの処理により、いずれも抑制された。さらに、非ペプチド性の選択的 NK_1 レセプターアンタゴニスト SR140333 の投与でも本毒素による浮腫が抑制された。一方、本毒素は、マウス肥満細胞腫の培養細胞である P-815 培養細胞からのヒスタミンの遊離を誘導しなかった（46）。さらに、本毒素の作用は、N 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤である ω -conotoxin、MVII A、ブラジキニン B_2 レセプターアンタゴニスト HOE140 で阻害された。その後、Nagahama らは、さらに詳細に血管透過性の亢進メカニズムについて検討するため、マウス皮下に β 毒素を投与し、投与部位で遊離されるサイトカインの測定を行った。その結果、本毒素は TNF- α や IL-1 β の遊離を促進し、これらサイトカイン遊離は、 β 毒素の抗体の前投与や SR140333 の投与により抑制された。また、抗 TNF- α 抗体の前投与により、血管透過性が抑制されたのに対し、抗 IL-1 β 抗体の前投与では血管透過性が抑制されなかった。以上より、 β 毒素が皮膚に存在する特異的なレセプターに結合し、直接、または、間接的に知覚神経のブラジキニン B_2 レセプター、および、N 型 Ca^{2+} チャネルに作用して Ca^{2+} の流入を引き起こし、神経末端からの SP の遊離を促進させる。遊離した SP は、2つの作用を示す。1つの作用は、毛細血管の透過性を亢進、さらに、肥満細胞を刺激し、その結果、遊離したヒスタミンが毛細血管に作用して最終的に血管透過性の亢進を引き起こす。もう 1つの作用は、 β 毒素処理により、SP が遊離され、 NK_1 レセプター

を刺激することによって、TNF- α が遊離され血管透過性の亢進が惹起されていることが推察された (Fig. 2) (47)。

β 毒素が壊疽性腸炎の病原因子であることはすでに明らかであるが、壊疽性腸炎を引き起こすメカニズムや、本毒素が小腸においてターゲットとする細胞は不明のままであった。2009年、Miclard等はPiglet壊疽性腸炎において、 β 毒素が病巣の小腸組織中の血管内皮細胞に局在していることを報告した(48)。本毒素のこの局在は壊疽性腸炎の初期から認められ、本毒素は感染初期に小腸粘膜固有層に侵入後、血管内皮細胞に障害を与え、血管壊死を起こし、壊疽性腸炎が進行すると推察された。また、同年、同研究グループがヒトの壊疽性腸炎においても、Pigletと同様に腸管粘膜固有層中の血管内皮細胞に β 毒素が局在していると報告した(49)。さらに、2010年、Gurtner等は、ブタのプライマリー大動脈内皮細胞に β 毒素を作用させると、細胞骨格のアクチンが破壊され、ネクローシスを誘導すると報告した(50)。2011年に、ヒトの血管内皮細胞においても同様の結果が報告され、今後の β 毒素の病原性を *in vitro* で解析するモデルとして血管内皮細胞が有用なツールとなる可能性がある(51)。その後、2013年には、プライマリーのブタ大動脈内皮細胞に β 毒素を作用させると、ネクロトーシスを起こすことも報告された(52)。2013年時点で、腸管管腔側に面している腸管上皮細胞への β 毒素の障害等は報告されておらず、本毒素がどのように腸管粘膜固有層中の内皮細胞に作用するかは、不明のままである。一方、2009年には、ヒト結腸癌細胞株であるCaco-2細胞とC型ウエルシュ菌を共培養すると、C型菌による β 毒素の産生が増加すると報告された(VirR/VirS)(53)。さらに、2015年Roosは、 β 毒素単独では、腸管上皮細胞に障害を示さないが、ウエルシュ菌や β 毒素以外の病原因子が腸管上皮細胞を破壊し、その後、 β 毒素が内皮細胞へと作用すると報告した(Fig. 3)(54)。

Steinthorsdottirらは、ヒト臍帯静脈上皮細胞に β 毒素を作用させると、本毒素は、細胞膜上でオリゴマーを形成すると報告した(55)。しかしながら、本毒素は、溶液中で容易にオリゴマーを形成するので、この細胞で特異的にモノマーからオリゴマーが形成されたかどうかは不明であった。一方、Shaturskyらは、 β 毒素をホスファチジルコリン(DOPC)とコレステロール(Chol)からなる平面脂質二重層膜に作用さ

せると、本毒素は、 Na^+ や K^+ のような一価のカチオン選択的な直径 12 Å のチャンネルを形成することを報告した (56)。この結果は、本毒素が膜上でポアを形成することを強く示唆したが、この報告では、人工膜上で β 毒素のオリゴマーの存在を示す結果は示されなかった。 β 毒素の細胞レベルでの作用の手がかりを得るため、Nagahamaらは、 β 毒素をマウス脾臓細胞に作用させると、本毒素が細胞からの K^+ イオンの遊離や毒性を示すことを見いだした。その後、血球系細胞でセルライン化されたヒト急性前骨髄性白血病細胞由来の HL-60 細胞に本毒素を作用させ、細胞の膨化作用を証明し、初めて本毒素に感受性の培養細胞を発見した (Fig. 4) (57)。この時、 β 毒素処理により細胞からの急速な K^+ の遊離、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Cl^- の流入、そして、膨化が認められる約 1 時間後から乳酸脱水素酵素 (LDH) の遊離が認められた。一方、本毒素による細胞の膨化は、浸透圧保護剤ポリエチレングリコール (PEG) 600 (直径 1.6 nm) と 1000 (直径 1.8 nm) で抑制され、PEG 400 (直径 1.36 nm) では抑制されないもので、 β 毒素は、直径 1.36~1.6 nm のポアを形成すると報告した。さらに、本毒素が、HL-60 細胞膜上の脂質ラフトに存在する特異的レセプターに結合し、ラフト上で 7 量体のオリゴマー (Fig. 5, 6) を形成して各種イオンを膜通過させ、膨化と細胞膜の破壊を引き起こすこと、さらに、DOPC と Chol のリポソームにおいても β 毒素がオリゴマーを形成し破壊することも明らかにした (57)。以上から、Fig. 6 に示すように、 β 毒素に対して感受性の細胞が見出され、本毒素は、細胞膜ラフトの特異的レセプターに結合後、オリゴマーを形成したことを初めて明らかにし、種々のイオンの流出入やサイトカインの遊離を引き起こし、細胞膨化作用を引き起こすことを報告した。

本研究で、著者は β 毒素の感受性細胞であるヒト単球系細胞株である THP-1 細胞を使用して、未だ報告されていない β 毒素のレセプターの探索を行った。次に、本毒素オリゴマー以外での細胞毒性に関わる分子の役割を明らかにするため、レセプターの共役分子に焦点を当て解析を行った。そして、 β 毒素が作用する宿主の抵抗性に関与する分子を検討した。

Table 1 Major toxins produced by the five different types of *Clostridium perfringens*.

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

+: Produced by some strains of the type given

- : Not produced by any strain of the type given

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

Smedley JG, *et al.*, *Rev. Phys. Biochem. Pharmacol.* **152**, 183-204 (2004)

Nagahama M, *et al.*, *Toxins* **7**, 396-406 (2015)

Table 2 Properties of *Clostridium perfringens* beta-toxin.

Molecular weight	34,681(309 residues)
Isoelectric point	5.5
Biological activity	Lethality, Dermonecrosis Elevation of blood pressure
Inhibitor	SH group modifying agent
Cytotoxicity	Swelling of HL-60 cells

Sakurai J and Nagahama M, *Toxin Rev.* **25**, 1-19 (2006)

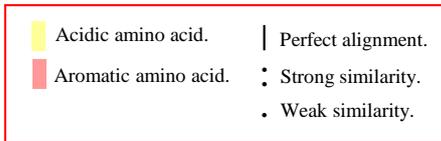
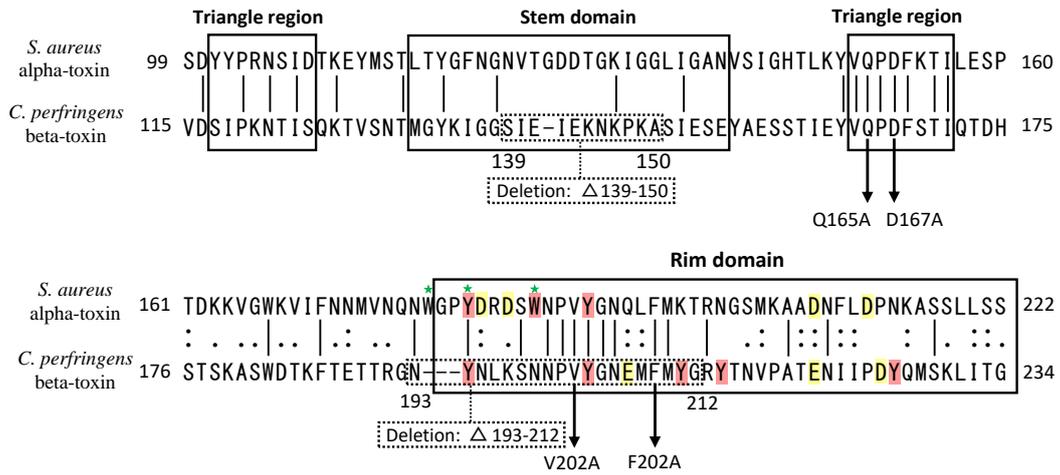
Nagahama M, *et al.*, *Toxins* **7**, 396-406 (2015)

Table 3 Sequence homology between beta-toxin and *Staphylococcal* toxins.

<i>Staphylococcal</i> toxin	M.W.	Homology with beta-toxin	Formation of oligomer
Alpha-toxin	36,000	28 %	+
Gamma-toxin (A component)	32,000	22 %	+
Gamma-toxin (B component)	34,000	28 %	+
Leukocidin (S component)	31,000	17 %	+
Leukocidin (F component)	32,000	28 %	+

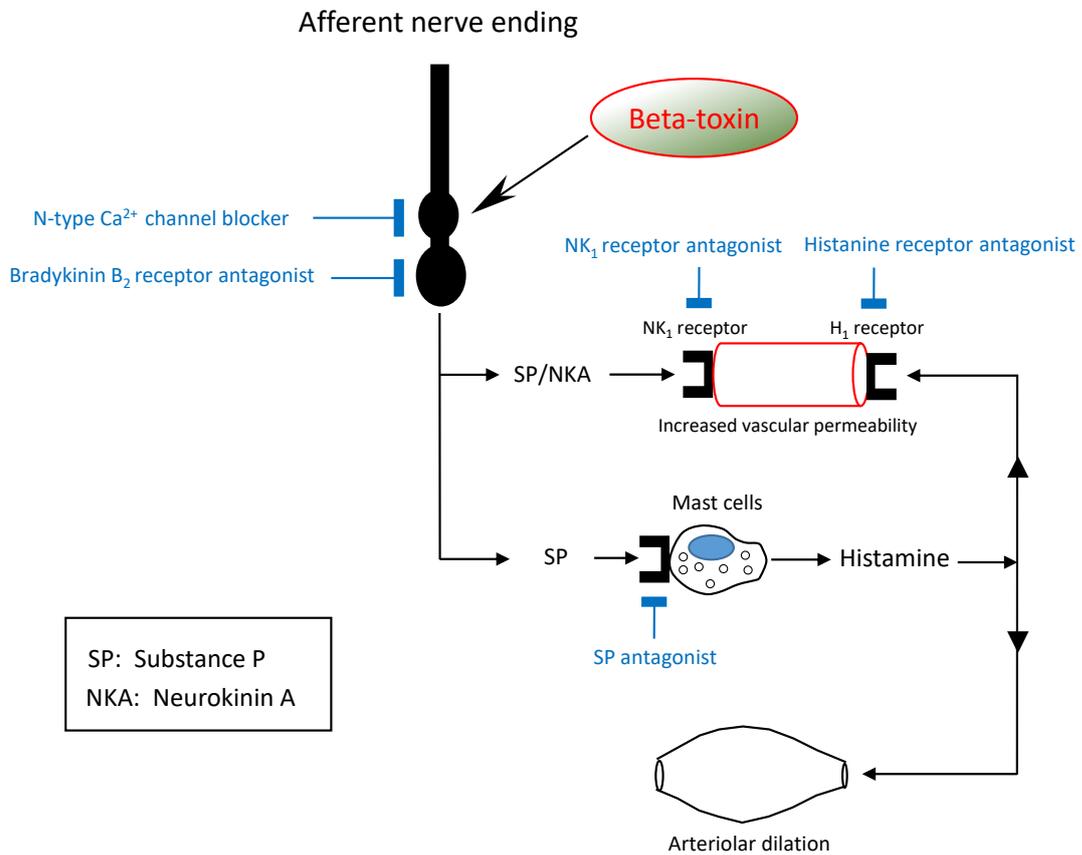
Hunter SE, et al., *Infect. Immun.* 61, 3958-3965 (1993)

Fig. 1 Amino acid residue deletion and site-directed mutagenesis of beta-toxin.



Sakurai J and Nagahama M, *Recent Res. Devel. Infect. Immun.* **1**, 433-449 (2003)
 Sakurai J and Nagahama M, *Toxin Rev.* **25**, 89-108 (2006)

Fig. 2 Action of beta-toxin on mouse skin.

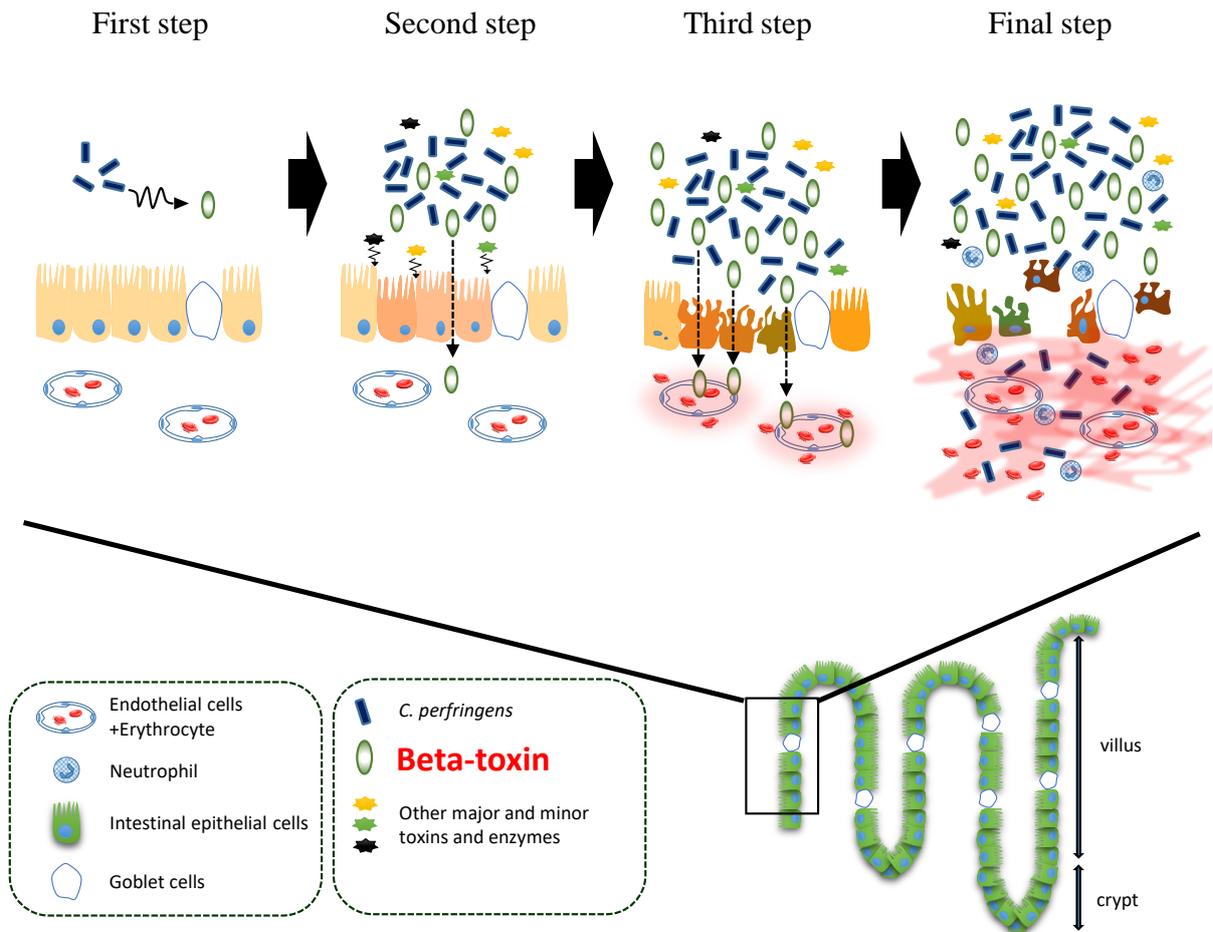


Nagahama M, *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* **138**, 23-30 (2003)

Sakurai J and Nagahama M, *Recent Res. Devel. Infect. Immun.* **1**, 433-449 (2003)

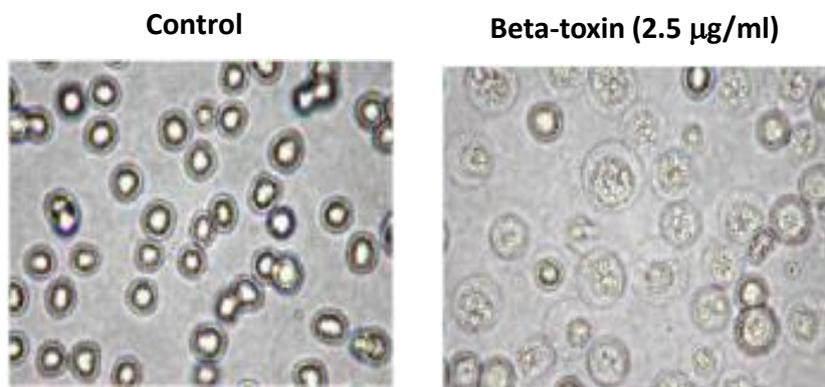
Fig. 3 Schematic model of *C. perfringens* type C infection.

Beta-toxin acts on intestinal endothelial cells.



Roos S, et al., *Toxins* 7, 1235-1252 (2015)

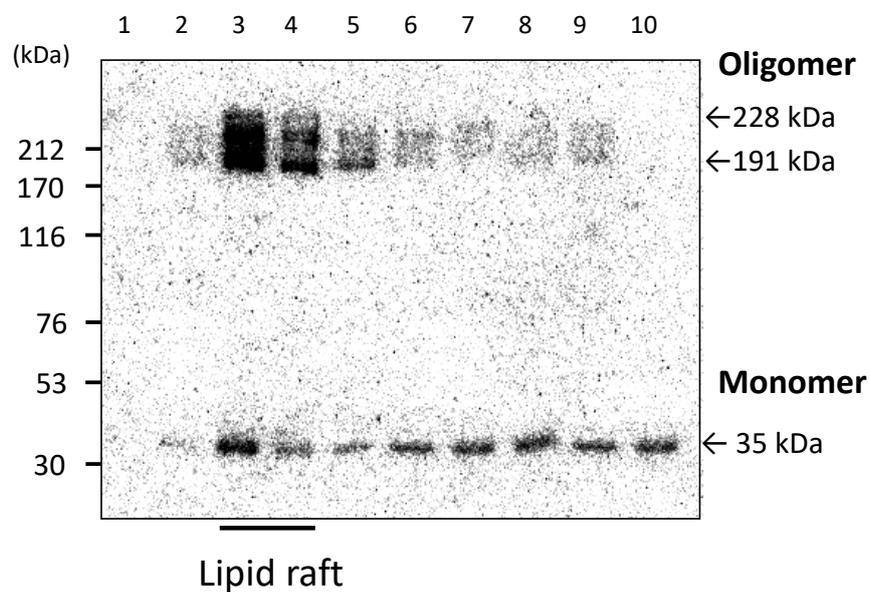
Fig. 4 Effect of beta-toxin on HL-60 cells.



Nagahama M, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278, 36934-36941 (2003)

Sakurai J and Nagahama M, *Toxin Rev.* 25, 1-19 (2006)

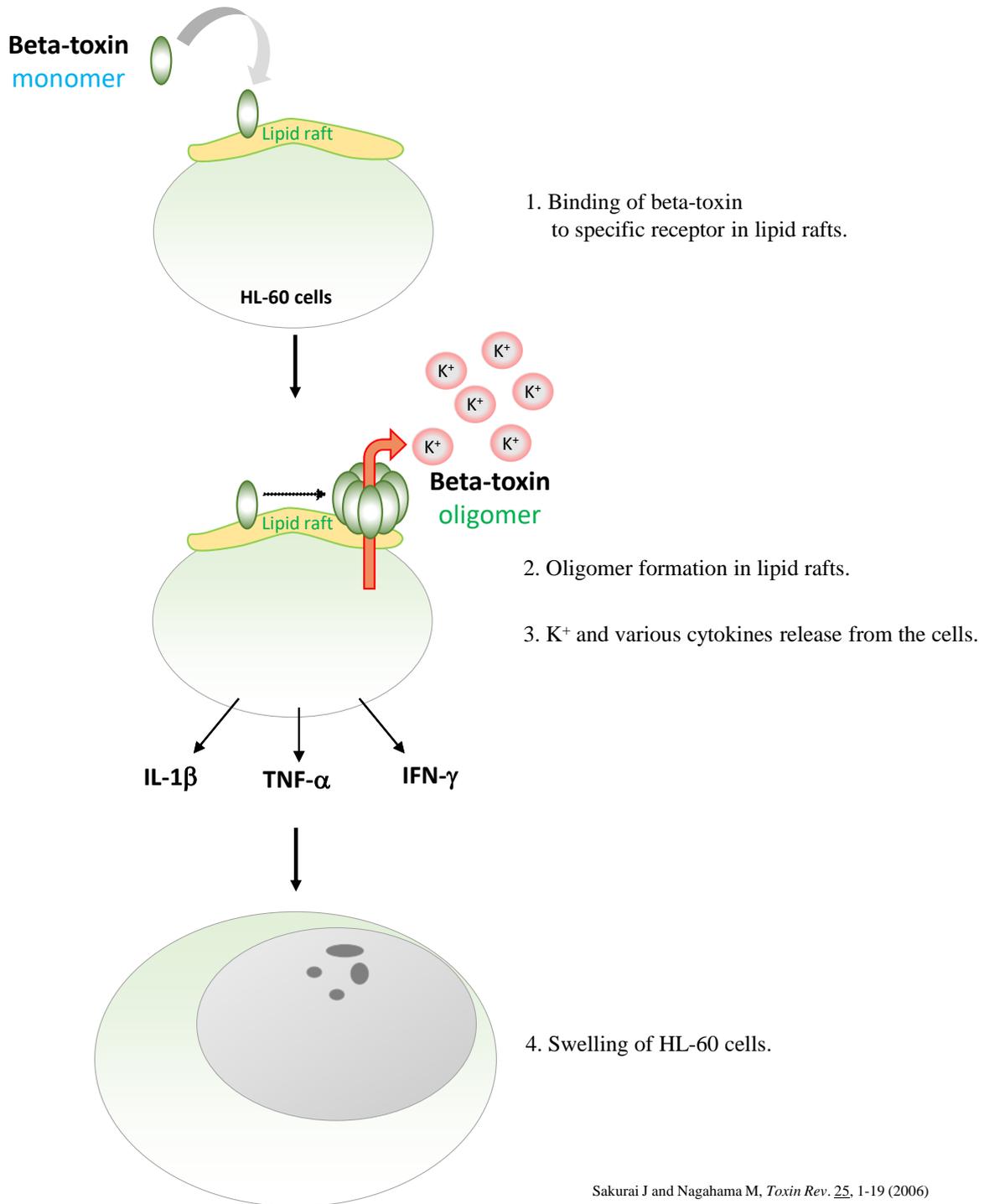
Fig. 5 Binding of beta-toxin to lipid raft of HL-60 cells.



Nagahama M, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278, 36934-36941 (2003)

Sakurai J and Nagahama M, *Toxin Rev.* 25, 1-19 (2006)

Fig. 6 Action of beta-toxin on HL-60 cells.



本 論

第一章 ウエルシュ菌β毒素のレセプター探索

C型ウエルシュ菌（C型菌）は、小腸上部の空腸において増殖して主要病原因子であるβ毒素を産生し、腸管上皮細胞に障害を与え、致死率の高い壊疽性腸炎を引き起こす。現在までに、C型菌感染症の治療戦略は、ワクチンとしてトキソイドの作成等の予防法が主流で、予防にはある程度有効であるが、β毒素の安定した精製が難しいことから実用化は困難である。さらに、C型菌感染の治療法は、現在まで確立されていない。著者は、β毒素の作用メカニズムを明らかにすれば、治療法の糸口が得られると考えた。そこで、本章では、未だ明らかにされていない本毒素のレセプターの探索を行い、本菌感染症の治療の手がかりを得るため検討を行った。

所属する研究室では、β毒素を様々な細胞に作用させた結果、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞やヒト白血病細胞株である HL-60 細胞、また、T リンパ系細胞の MOLT-4 細胞や B リンパ系の BALL-1 細胞、そして、マウス脾臓細胞など、主に免疫系の細胞に本毒素は障害を示した。この結果より、免疫系細胞に多く発現している分子が、本毒素の細胞毒性に関与している可能性が推察された。β毒素は、β-pore-forming toxin (β-PFT) ファミリーに属し、同じファミリーの *S. aureus* α-toxin は細胞膜表面に発現している A-Disintegrin-and-metalloproteinase 10 (ADAM10) がレセプターとして知られているが (58-60)、その他に P2X レセプター (P2XR) を活性化して毒性発現する報告 (61) がある。これらの知見より、P2XR は免疫系細胞でも多く発現すること、同じβ-PFT ファミリーの *S. aureus* α-toxin が P2XR を介して毒性を発現すること、さらに、P2XR は腸管上皮において、様々な炎症反応に寄与すること (62, 63) などを統合的に判断して、著者は、P2XR に着目し、β毒素の結合における役割を検討した。

第一節 β毒素の細胞毒性と P2X レセプターの関係

β毒素は、感受性を示す細胞が少なく、その中で血球系の THP-1 細胞や HL-60 細胞等に作用して、細胞の膨化と細胞死を誘導することから、血球系細胞にβ毒素の特異性の高いレセプターが存在すると推察される。本節では、β毒素のレセプターを明らかにするため、免疫系細胞に発現し、また、β-PFT の毒性に重要な役割を果たしている ATP レセプター (ATPR) に着目し、β毒素の細胞毒性発現における ATPR (P2X レセプター (P2XR) ファミリーと P2Y レセプター (P2YR) ファミリー) の役割を検討した。

【実験材料および実験方法】

1) 細胞培養法 (THP-1 細胞)

<実験材料>

血清の非動化: 4°C で溶解した Fetal Bovine Serum [Biowest] 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、非動化を行った。血清は濾過せずに、50 ml ポリプロピレンテストチューブ (PP-チューブ) [Greiner bio-one, 210261] に分注し、保存は-80°C で行い、使用前日に低温室で溶解した。使用時に、低温室で解凍後、1,000 rpm、10 分間遠心し、上清を使用した。

10% Fetal bovine serum (FBS) - Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) (FBS/RPMI 1640) の調製: RPMI 1640 with D-(+)-Glucose and L-Glutamine and Phenol Red [Nacalai tesque, 30264-14] 500 ml に、クリーンベンチ内で、Penicillin-Streptomycin [Gibco, 15140-122] 5.6 ml、および、非動化した Fetal Bovine Serum 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ブの蓋を拭き、5.0 ml の滅菌ピペット [Greiner bio-one, 604181] を用いて、予め 4.0 ml の FBS/RPMI 1640 培地が入った 15 ml PP-チューブ [Greiner bio-one, 188271] に全量を移した。軽く転倒混和し、室温で 800 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、1.0 ml の FBS/RPMI 1640 培地で懸濁後、予め 10 ml の FBS/RPMI 1640 培地が入った 75 cm² の浮遊培養用フラスコ (Cell Culture Flasks) [Greiner bio-one, 658-195] 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。

セルカウントと細胞の継代培養: 75 cm² 浮遊培養用フラスコで培養した細胞を、クリーンベンチ内で全量を 50 ml PP-チューブに移し、室温で 800 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、1.0 ml の FBS/RPMI 1640 培地で懸濁後、その懸濁液 10 µl を 990 µl の滅菌 PBS (-) が入った 1.5 ml チューブ [Eppendorf, 131-715C] に移し、100 倍希釈した。その細胞懸濁液 10 µl を 0.5% トリパンプルー 10 µl で懸濁後、Burker-Turk 血球計算盤を用いセルカウントを行った。あらかじめ 10 ml の FBS/RPMI 1640 培地を入れた 75 cm² 浮遊培養用フラスコにカウントした細胞をまき (生細胞密度: 1~2×10⁵ cells/ml 程度)、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 浮遊培養用フラスコを使用した。

<使用したプレート>

- ・浮遊細胞用 12 well プレート [Greiner bio-one, 665 102] → 1.0 ml ずつ接種
- ・浮遊細胞用 24 well プレート [Greiner bio-one, 662 102] → 0.6 ml ずつ接種
- ・浮遊細胞用 48 well プレート [Greiner bio-one, 677 102] → 0.3 ml ずつ接種
- ・浮遊細胞用 96 well プレート [Greiner bio-one, 655 185] → 0.1 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] → 6.0 ml ずつ接種

細胞の凍結保存: 75 cm² の浮遊培養用フラスコで培養した THP-1 細胞を、クリーンベンチ内で全量を 15 ml PP-チューブに移し、室温で 800 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、細胞凍結保存液セルバンカー1

プラス [日本全薬工業, 804010] 1×10^6 cells/ml となるよう細胞を懸濁した。この懸濁液 1.0 ml を 2.0 ml セラムチューブ [TPP, 89020] に移し、 -80°C [Sanyo, MDF-C8V] で保存した。

2) ATP レセプター阻害剤の β 毒素の細胞毒性に対する効果

<実験材料>

α -ATP の調製 [Sigma-Aldrich, A6779] M.W. 505.17: Adenosine 5' -triphosphate, periodate oxidized sodium salt 2.53 mg を滅菌 PBS (-) 50 μl で溶解し、100 mM とした。細胞処理時に滅菌 PBS (-) で 10 倍希釈 (10 mM) し、希釈液を培地 100 μl に対して 5 μl 添加した (終濃度: 500 μM)。

α -ADP の調製 [Sigma-Aldrich, A6904] M.W. 425.19: Adenosine 5' -diphosphate, periodate oxidized sodium salt 2.13 mg を滅菌 PBS (-) 50 μl で溶解し、100 mM とした。細胞処理時に滅菌 PBS (-) で 10 倍希釈 (10 mM) し、希釈液を培地 100 μl に対して 5 μl 添加した (終濃度: 500 μM)。

BBG の調製 [東京化成, 6104-58-1] M.W. 854.02: Brilliant blue G 1.02 mg を滅菌 PBS (-) 200 μl で溶解し、6 mM とした。細胞処理時に滅菌 PBS (-) で 100 倍希釈 (60 μM) し、希釈液を培地 100 μl に対して 5 μl 添加した (終濃度: 3 μM)。

Suramin の調製 [Calbiochem, 574625] M.W. 1429.2: Suramin 7.146 mg を滅菌 PBS (-) 500 μl で溶解し、10 mM とした。細胞処理時に滅菌 PBS (-) で 5 倍希釈 (2 mM) し、希釈液を培地 100 μl 中に対して 5 μl 添加した (終濃度: 100 μM)。

PPADS の調製 [Sigma-Aldrich, P178] M.W. 599.31: Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonic acid 3.0 mg を滅菌 PBS (-) 200 μl で溶解し、25 mM とした。細胞処理時に滅菌 PBS (-) で 5 倍希釈 (5 mM) し、希釈液を培地 100 μl 中に対して 5 μl 添加した (終濃度: 250 μM)。

※ 溶解した阻害剤は、全て -30°C で保存した。

Cell Counting Kit-8 (MTS 試薬) [Dojindo, 343-07623]

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、96 well プレートに THP-1 細胞を

1×10⁵ cells/100 μl/well (FBS/RPMI 1640 培地) で播種し、Negative control には滅菌 PBS (-) を添加し、阻害剤の終濃度 500 μM o-ATP、500 μM o-ADP、3 μM BBG、100 μM Suramin、250 μM PPADS で細胞を処理し、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間インキュベーションした。その後、β毒素 (終濃度: 0.5 μg/ml) を添加し、1 時間インキュベーション後、倒立顕微鏡 [Nikon, Eclipse TS100] で細胞形態を観察した。また、Cell Counting Kit-8 (MTS 試薬) を 10 μl ずつ添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 3 時間インキュベーションした。マイクロプレートリーダー [Molecular Devices, SPECTRA MAX 190] で 450 nm の吸光度を測定した。

3) THP-1 細胞へのβ毒素の結合

<実験材料>

SDS-PAGE 用ゲル: NextPageIII 10 % gel [GelleX, GLX-321M]

SDS-PAGE に用いる試薬

SDS sample buffer の調製: 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) を 25 ml と SDS 粉末 [Nacalai tesque, 31607-65] 2.0 g と Glycerol [Nacalai tesque, 17018-83] 10 ml を混合し、蒸留水で 100 ml にメスアップし、溶解した。用時、2-mercaptoethanol [Wako, 139-07525] を終濃度 10%となるよう添加し、使用した。(終濃度: 0.125 M Tris-HCl, 2%SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 10% Glycerol)

SDS-PAGE running-buffer の調製: Tris [Nacalai tesque, 35434-21] 6.0 g、Glycine [Nacalai tesque, 17109-35] 28.8 g、SDS 粉末 2.0 g を適当量の蒸留水に溶解し、蒸留水で 2,000 ml にした。

Western blotting に用いる試薬

20% Methanol buffer の調製: Tris 6.0 g、Glycine 28.8 g を適当量の蒸留水に溶解し、Methanol [Nacalai tesque, 21929-23] 400 ml を加え、蒸留水で 2,000 ml にした。

0.1% Tween 20-TBS の調製: NaCl [Nacalai tesque, 31320-05] 45.0 g を 0.2 M Tris-buffer 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% Methanol-7.5% Acetic acid solution の調製: Methanol 250 ml に、Acetic acid [Nacalai tesque, 00212-43] 75 ml、蒸留水を添加し、全量 1,000 ml とした。

Blocking One [Nacalai tesque, 03953-95]: PVDF 膜のブロッキング時には原液を使用した。また、一次抗体、二次抗体の希釈液として使用する際は、0.1% Tween 20-TBS で 20 倍希釈となるように Blocking One を添加した。

1% CBB 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。

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗β毒素ウサギ抗体) の調製: 0.1% Tween 20-TBS 19 ml を大試験管に加え、Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG 10 μl と Blocking One 1.0 ml を添加し、懸濁後、4°C で保存した。使用時は、この液をそのままプラスチック容器に添加し、振とうした。使用後は、この液を回収し、4°C で保存した。[3 週間の保存期間で、複数回使用できる。]

抗β-actin 抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 19 ml を大試験管に加え、Anti-β-actin rabbit polyclonal IgG [BioLegend, 622102] 1 μl と Blocking One 1.0 ml を添加し、懸濁後、4°C で保存した。使用時は、この液をそのままプラスチック容器に添加し、振とうした。使用後は、この液を回収し、4°C で保存した。[3 週間の保存期間で、複数回使用できる。]

HRP 結合型抗ウサギ抗体 (ウサギ二次抗体) の調製: 0.1% Tween 20-TBS 19 ml を大試験管に加え、Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] 1 μl と Blocking One 1.0 ml を添加し、懸濁後、4°C で保存した。使用時は、この液をそのままプラスチック容器に添加し、振とうした。使用後は、この液を回収し、4°C で保存した。[3 週間の保存期間で、複数回使用できる。]

<実験方法>

サンプル調製～SDS-PAGE: 本論文の第一章第一節-1)と同様の方法で、48 well プレートに THP-1 細胞を 5×10^5 cells/300 μl/well (FBS/RPMI 1640 培地) で播種した。その後、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションし、細胞を馴化した。

o-ATP (終濃度: 500 μ M) を細胞に添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間インキュベーションした。その後、 β 毒素 (終濃度: 0.5 μ g/ml) を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 15、30、60 分間インキュベーションした。その後、細胞を 1.5 ml チューブに回収し、室温で 1,500 rpm、5 分間遠心し、上清を除去した。滅菌 PBS (-) を 1.0 ml 添加し、細胞を懸濁後、再度、室温で 1,500 rpm、5 分間遠心を行った。上清除去後、SDS sample buffer 100 μ l 加え、1 分間超音波処理後、26G の注射針 [NIPRO, 01-046] を付けた 1.0 ml シリンジでサスペンションし、粘稠性を無くした。その後、37°C の恒温槽で 2 時間インキュベーションし、1.0% CBB 溶液を少量添加し 10% Real gel plate [Gellax, SDB-521] に 20 μ l ずつアプライした。30 mA、555 V で 1 時間通電し、SDS-PAGE を行った。この際、PVDF 膜 [Millipore, ISEQ26260] を Methanol で約 1 分間振とうし親水化後、20% Methanol buffer で約 1 時間振とうした。

Western blotting の方法: 20% Methanol buffer に馴染んだ PVDF 膜を、SDS-PAGE 後のゲルと重ね合わせ、20% Methanol buffer 中で 40 V、0.1 A で 2 時間、室温で転写した。転写後、PVDF 膜を 0.1% Tween-TBS で 5 分間振とうし、洗浄した (3 回)。その後、ハイブリバッグ [コスモバイオ, S-1001] に PVDF 膜を入れ、1.5 ml の Blocking One を添加し、パッキング後、30 分間ブロッキングした。PVDF 膜を 0.1% Tween-TBS で 10 分間振とうし、洗浄した (3 回)。その間、一次抗体 (抗 β 毒素ウサギ抗体) を調製した。洗浄後の PVDF 膜は、蓋つきのプラスチックケースに、調製した一次抗体を添加し、4°C (低温室) 条件下で振とうし、O/N した。翌日、一次抗体調製液を回収し、PVDF 膜を 0.1% Tween-TBS で 15 分間振とうし、洗浄した (3 回)。その間、二次抗体 (HRP 結合型抗ウサギ抗体) を調製した。洗浄後の PVDF 膜は 37°C で二次抗体と 1 時間反応させた。反応後、二次抗体調製液を回収し、PVDF 膜を 0.1% Tween-TBS で 10 分間振とうし、洗浄した (3 回)。

PVDF 膜の解析法: Immobilon western chemiluminescent HRP substrate の HRP substrate peroxide solution 250 μ l、HRP substrate luminol reagent 250 μ l [Millipore, WBKLS0100]、および、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。その間、洗浄後の PVDF 膜をラップに移し、余分な水分を吸い取り、

PVDF 膜を Image reader LAS-4000 [Fuji film] で解析した。解析後、PVDF 膜を CBB 染色液で染色し、脱色液を用いて脱色した。

4) P2X₇R ノックダウン THP-1 細胞に対するβ毒素の結合や細胞毒性

A) siRNA のトランスフェクション法

P2X₇R siRNA の調製: Hs P2X₇R_1 [Qiagen, SI-00039508]、Hs P2X₇R_2 [Qiagen, SI-00039515]、Hs P2X₇R_3 [Qiagen, SI-00039522]、Hs P2X₇R_5 [Qiagen, SI-03056438]の各々の siRNA (1 nmol) 粉末を付属の H₂O 100 μl で溶解した (濃度: 10 μM)。調製液は 5 μl ずつ分注し、-30°C で保存した。

P2Y₂R siRNA の調製: Hs P2Y₂R_1 [Qiagen SI-00039564]、Hs P2Y₂R_2 [Qiagen SI-00039571]、Hs P2Y₂R_4 [Qiagen SI-00039585]、Hs P2Y₂R_6 [Qiagen SI-03118493]の各々の siRNA (1 nmol) 粉末を付属の H₂O 100 μl で溶解した (濃度: 10 μM)。調製液は 5 μl ずつ分注し、-30°C で保存した。

P2Y₆R siRNA の調製: Hs P2Y₆R_1 [Qiagen SI-00159635]、Hs P2Y₆R_2 [Qiagen SI-00159642]、Hs P2Y₆R_3 [Qiagen SI-00159649]、Hs P2Y₆R_5 [Qiagen SI-02649234] の各々の siRNA (1 nmol) 粉末を付属の H₂O 100 μl で溶解した (濃度: 10 μM)。調製液は 5 μl ずつ分注し、-30°C で保存した。

Negative control siRNA の調製: AllStars Negative control siRNA [Qiagen, SI03650318] の siRNA (5 nmol) 粉末を付属の H₂O 250 μl で溶解した (濃度: 20 μM)。

種々の siRNA をデータシート記載の細胞数に対して、2.5 μl ずつ (合計: 10 μl、各々の siRNA の終濃度: 250 nM) を添加し、Neon™ Transfection System を用いてエレクトロポレーションを行った。Negative control siRNA は、2.5 μl 添加 (終濃度: 500 nM) し、エレクトロポレーションを行った。

Neon™ Transfection System 100 μL Kit [Thermo, MPK10025]

Neon™ Transfection System [Thermo, MPK5000]

<実験方法>

予め、48 well プレートに FBS/RPMI 1640 培地を 300 μ l を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下でインキュベーションしておく。培養した THP-1 細胞をクリーンベンチ内で 50 ml の PP-チューブに移し、室温で 800 rpm、5 分間遠心後、上清を除去した。その沈渣を、滅菌 PBS (-) 1.0 ml に懸濁し、細胞懸濁液を予め滅菌 PBS (-) を 990 μ l 加えておいた滅菌 1.5 ml チューブに 10 μ l 加えて 100 倍希釈した。100 倍希釈液 10 μ l と 0.5% トリパンブルー 10 μ l と混合し、Burker-Turk 血球計算盤を用いセルカウントをした。滅菌 1.5 ml チューブに 1×10^6 cells/tube となるよう分注し、室温で 800 rpm、5 分間遠心した。遠心後、上清を除去し、キット付属の Buffer R 105 μ l で細胞を懸濁した (Buffer R は細胞障害性があるので、作業を 15 分以内に終わらせる)。目的の siRNA 4 種を細胞懸濁液に 2.5 μ l ずつ添加し(合計: 10 μ l、各々 siRNA 終濃度: 250 nM)、懸濁後、NeonTM Transfection System のピペットに専用の 100 μ l NeonTM ピペットチップを装着し、細胞を泡が入らないように充填した。その後、ピペットを NeonTM ステーションに装着し、エレクトロポレーション [Voltage: 1,400 V, Width: 20 width, Number: 1] を行った。その後、 1×10^5 cells/well で、2 日培養後、実験に使用した。

B) P2X₇R、P2Y₂R、P2Y₆R のノックダウンの確認法

<実験材料>

使用した抗体

抗 P2X₇R 抗体の調製: Anti-P2X₇R (H-265) rabbit polyclonal IgG [Santa Cruz, sc-25698] を第一章第一節-4)-B) と同様の方法で調製した。

抗 P2Y₂R 抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 19 ml を大試験管に加え、Anti-P2Y₂R (H-70) rabbit polyclonal IgG [Santa Cruz, sc-20124] 20 μ l と Blocking One 1.0 ml を添加し、懸濁後、4°C で保存した。使用時は、この液をそのままプラスチック容器に添加し、振とうした。使用後は、この液を回収し、4°C で保存した。[3 週間の保存期間で、複数回使用できる。]

抗 P2Y₆R 抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 19 ml を大試験管に加え、Anti-P2Y₆R (H-70) rabbit polyclonal IgG [Santa Cruz, sc-20127] 20 μ l と Blocking One 1.0 ml

を添加し、懸濁後、4°C で保存した。使用時は、この液をそのままプラスチック容器に添加し、振とうした。使用後は、この液を回収し、4°C で保存した。[3 週間の保存期間で、複数回使用できる。]

抗 β -actin 抗体の調製: Anti- β -actin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

ノックダウン細胞の調製は、第一章第一節-4)-A) に従って行った。2 日培養後、細胞を 1.5 ml チューブに回収し、室温で 1,500 rpm、5 分間遠心し、上清を除去した。滅菌 PBS (-) を 1.0 ml 添加し、細胞を懸濁後、再度、室温で 1,500 rpm、5 分間遠心した。上清除去後、第一章第一節-3) に従って、SDS-PAGE、Western blotting を行い、LAS-4000 で解析した。

C) P2X₇R、P2Y₂R、P2Y₆R ノックダウン THP-1 細胞における β 毒素の毒性評価

<実験材料>

第一章第一節-4)-A) と第一章第一節-2) 同じ。

<実験方法>

ノックダウン細胞の調製は、第一章第一節-4)-A) に従って行った。種々の P2R をノックダウンし、2 日培養した。細胞生存率の測定は、第一章第一節-2) の方法に従って MTS 法で解析した。

D) P2X₇R ノックダウン THP-1 細胞への β 毒素の結合

<実験材料>

第一章第一節-4)-A) と第一章第一節-3) に示した。

<実験方法>

ノックダウン細胞の調製は、第一章第一節-4)-A) に従って行った。P2X₇R をノックダウン後、2 日間培養した。 β 毒素の結合は、第一章第一節-3) の方法に従って行い、LAS-4000 で解析した。

5) P2X₇R 発現 HEK293 細胞に対する β 毒素の作用

A) 細胞培養法 (HEK293 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、滅菌メディアウム瓶 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's Medium (D-MEM)

(FBS/D-MEM): D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red [Nacalai tesque, 08458-45] 500 ml に、クリーンベンチ内で、Penicillin-Streptomycin 5.6 ml、および、非動化した Fetal Bovine Serum 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: 第一章第一節-1) に従って、HEK293 細胞を調製した。予め 10 ml の FBS/D-MEM 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 HEK293 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、37°C の滅菌 PBS (-) 5.0 ml でリンス後、吸引した。その後、0.5%-Trypsin/5.3 mM-EDTA Solution [Nacalai tesque, 35556-44] 1.0 ml を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 2 分間インキュベーションした。細胞が完全に剥離した後、タッピングし、5.0 ml の FBS/D-MEM 培地で懸濁し、全量を 15 ml PP-チューブに移した。25°C で 800 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、1.0 ml の FBS/D-MEM 培地で懸濁後、予め 11 ml の FBS/D-MEM 培地が入った 75 cm² 組織培養用フラスコに 0.2 ml (1~2×10⁶ cells) 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, 665180] → 1.0 ml ずつ接種
- ・ 付着細胞用 24 well プレート [Greiner bio-one, 662160] → 0.6 ml ずつ接種
- ・ 付着細胞用 48 well プレート [Greiner bio-one, 667180] → 0.3 ml ずつ接種
- ・ 付着細胞用 96 well プレート [Greiner bio-one, 655180] → 0.1 ml ずつ接種
- ・ 付着細胞用蛍光測定用 96 well 黒プレート [Nunc, 165305] → 0.1 ml ずつ播種

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 HEK293 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後、37°C の滅菌 PBS (-) 5.0 ml でリンス後、吸引した。その後、0.5%-Trypsin/5.3 mM-EDTA Solution 1.0 ml を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 2 分間インキュベーションした。細胞が完全に剥離した後、タッピングし、5.0 ml の FBS/D-MEM 培地で懸濁し、全量を 15 ml PP-チューブに移し、25°C で 800 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、セルカウント後、細胞凍結保存液セルバンカー1 プラスを細胞が 1×10⁶ cells/ml となるよう添加し、懸濁した。この懸濁液を 1.0 ml ずつセラムチューブに移し、-80°C で保存した。

B) HEK293 細胞への P2X₇R のトランスフェクション

<実験材料>

pcDNA-Zeo (+) 3.1 [Invitrogen, 43-0020]: 哺乳動物発現用ベクター。Ampicillin と Zeosin 耐性遺伝子を持つ。

pcDNA-P2X₇R の作成: 2008 年白井秀典 修論 参照

<実験方法>

予め、48 well プレートに FBS/D-MEM 培地を 300 μl を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下でインキュベーションしておく。第一章第一節-5)-A) の方法で HEK293 細胞を滅菌 PBS (-) 1.0 ml で 5×10⁷ cells/ml に調製した。調製した細胞は、滅菌 1.5 ml チューブに 100 μl ずつ分注し (5×10⁶ cells/tube)、室温で 800 rpm、5 分間遠心した。遠心後は、第一章第一節-4)-A) と同様の方法で細胞を Buffer R に再懸濁した。pcDNA-P2X₇R を 10~20 μg を添加し (液量 10 μl 以下) 懸濁後、Neon™ Transfection System のピペットに専用の 100 μl Neon™ ピペットチップを装着し、

細胞を泡が入らないように充填した。その後、ピペットを Neon™ ステーションに装着し、エレクトロポレーション [Voltage: 1,100 V, Width: 20 width, Number: 2] を行った。その後、 1×10^5 cells/well となるよう、予め用意しておいた 48 well プレートに播種し、1 日培養後、各々の実験に使用した。

C) HEK293 細胞における P2X₇R の発現の確認法

<実験材料>

使用した抗体

抗 P2X₇R 抗体の調製: Anti-P2X₇R (H-265) rabbit polyclonal IgG [Santa Cruz, sc-25698] を第一章第一節-4)-B) と同様の方法で調製した。

抗β-actin 抗体の調製: Anti-β-actin rabbit polyclonal IgG [BioLegend, 622102] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体(抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

pcDNA-P2X₇R のトランスフェクションは、第一章第一節-5)-B) に従って行った。1 日培養後、上清の FBS/D-MEM 培地を除去し、滅菌 PBS (-) 300 μl で 2 度洗浄した。上清除去後、SDS sample buffer 100 μl 加え、細胞をかきとり後、ライセートを全量 1.5 ml チューブに回収した。回収したライセートは、5 分間煮沸を行い、その後、第一章第一節-3) に従い、SDS-PAGE、Western blotting を行い、LAS-4000 で P2X₇R の発現を解析した。

D) P2X₇R 発現 HEK293 細胞におけるβ毒素の細胞毒性

<実験材料>

第一章第一節-5)-B) と第一章第一節-2) 同じ。

<実験方法>

pcDNA-P2X₇R のトランスフェクションは、第一章第一節-5)-B) に従って行い 96 well プレートに 5×10^4 cells/well で播種した。1 日培養後、上清の FBS/D-MEM 培地を除去し、滅菌 PBS (-) 200 μl で洗浄後、新しい FBS/D-MEM 培地を 100 μl 添加

し、37°C、5% CO₂の条件下で30分間馴化した。β毒素（終濃度：0.5 μg/ml）を添加し、37°C、5% CO₂の条件下で1時間インキュベーションした。細胞生存率の測定は、第一章第一節-2)の方法に従ってMTS法で解析した。

E) P2X₇R 発現 HEK293 細胞におけるβ毒素の結合

<実験材料>

第一章第一節-5)-B) と第一章第一節-3) に示した。

<実験方法>

pcDNA-P2X₇R のトランスフェクションは、第一章第一節-5)-B) に従って行い 48 well プレートに 1×10⁵ cells/well で播種し、1日培養を行った。β毒素の結合の解析は、第一章第一節-5)-C)の方法に従って細胞を馴化後、β毒素（終濃度：0.5 μg/ml）を添加し、37°C、5% CO₂の条件下で30分間インキュベーションした。その後、第一章第一節-5)-C)の方法に従って細胞を洗浄、かきとりを行い、第一章第一節-3)に従って、SDS-PAGE、Western blotting を行い、LAS-4000 で解析した。

F) β毒素の P2X₇R 発現 HEK293 細胞への Ca²⁺流入作用

<実験材料>

Normal working buffer (HEPES-tyrode 0.1% BSA + Ca²⁺)の調製: 下記の組成の Buffer。1 N NaOH で pH 7.4 に調整し、用時に、BSA を 0.1% になるよう添加した。

Acrodisc 25 μm Syringe Filter [Pall Corporation, PN 4612] で濾過滅菌した。

Reagent	Final Conc.	M.W.	g/L
NaCl	140 mM	58.44	8.2
KCl	2.7 mM	74.56	0.2
CaCl ₂	2.3 mM	110.9	0.26
NaHCO ₃	12 mM	84.01	1.0
D-glucose	5.6 mM	180.1	1.0
NaH ₂ PO ₄	0.48 mM	119.98	0.06
HEPES	25 mM	238.3	61
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.49 mM	203.3	0.1

Fura 2-AM (5 μM Fura 2-AM in Normal working buffer)の調製: 1 mM Fura

2-AM [Dojindo, 348-05831] 5 μ l と Normal working buffer 1.0 ml を遮光 1.5 ml チューブで混和し、調製した (終濃度: 5 μ M)。

Bz-ATP の調製 [Sigma-Aldrich, B6396] M.W. 715.39:

2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate 3.58 mg を滅菌 PBS (-) 0.5 ml で溶解し、10 mM とした。細胞処理時に培地 100 μ l に対して 1 μ l 添加した (終濃度: 100 μ M)。

<実験方法>

pcDNA-P2X₇R のトランスフェクションは、第一章第一節-5)-B) に従って行い、96 well で底面が透明の黒プレート [Nunc, 165305] に 5×10^4 cells/well で播種し、1 日培養を行った。第一章第一節-5)-C) の方法に従って細胞を馴化後、上清を除去し、5 μ M Fura 2-AM in Normal working buffer 100 μ l を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で、30 分間インキュベーションした。上清を除去し、Normal working buffer 100 μ l で 2 回洗浄後、Normal working buffer を 100 μ l 添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で、10 分間インキュベーションした。β毒素 (終濃度: 0.5 μ g/ml) を添加し、Positive control として、Bz-ATP (終濃度: 100 μ M) を添加し、Tecan Infinite Pro200 にセットし、37°C 条件下で、経時的に蛍光強度を測定した。[測定条件: Ex: 340 nm, Em: 510 nm]

<実験成績>

第一節では、ウエルシュ菌β毒素の THP-1 細胞に対する細胞毒性発現における P2XR の関与を解析した。まず、THP-1 細胞を P2XR 阻害剤である Suramin と PPADS (64)、そして、P2X₇R 選択的阻害剤である o-ATP、o-ADP、および、BBG (65, 66) で予め処理し、β毒素を作用させ、細胞生存率を検討した。その結果、Fig. 7A に示すように、今回使用したいずれの阻害剤でも本毒素の細胞毒性を強く抑制した。その中で、特に P2X₇R 選択的阻害剤が強い毒性抑制作用を示した。次に、最も毒性を抑制した o-ATP の、β毒素の結合に与える影響を抗β毒素抗体を用いた Western blotting で検討した。THP-1 細胞とβ毒素をインキュベーションすると、PBS 存在下ではβ毒素は、時間に依存してオリゴマーの結合が増加した。一方、予め o-ATP で処理すると、本毒素の結合が強く阻害された (Fig. 7B)。すなわち、β毒素は P2X₇R に結合して作用する可能性が推察された。そこで、本毒素の作用における P2X₇R の役割をさらに解明するため、P2X₇R のノックダウンや強制発現した細胞を使用して検討を行った。まず、THP-1 細胞に P2X₇R の siRNA をトランスフェクトし P2X₇R のノックダウンを行い、β毒素の作用や結合を検討した (Fig. 8)。その結果、Intact 細胞や Negative control (NC) siRNA をトランスフェクトした細胞 (NC 細胞) と比較して、Fig. 8A に示すように P2X₇R siRNA トランスフェクト細胞では、P2X₇R の発現が抑制された (Fig. 8A)。これらの細胞を用いて検討すると、P2X₇R ノックダウン細胞では、本毒素の細胞毒性やβ毒素の結合が Intact 細胞や NC 細胞と比較して、著しく減少した (Fig. 8B, 8C)。以上より、β毒素の結合に P2X₇R が関与している可能性が強く示唆された。一方、THP-1 細胞には、P2 レセプター (P2R) のアイソフォームである P2Y₂R と P2Y₆R が発現していることが知られている (67)。そこで、それぞれの P2Y レセプターを siRNA を用いてノックダウンを行い、本毒素の細胞毒性を検討した。Fig. 9A と 9B に示すように、P2Y₂R siRNA と P2Y₆R siRNA をトランスフェクトした THP-1 細胞では P2Y₂R と P2Y₆R のノックダウンが認められた。これらの細胞にβ毒素を作用させると、本毒素の細胞毒性は Intact 細胞や NC-siRNA 処理細胞と同程度で、ノックダウンしてもβ毒素の作用は抑制されなかった (Fig. 9C)。以上より、

本毒素の細胞毒性に P2Y₂R や P2Y₆R は関与せず、β毒素は P2X₇R に特異的に作用していることが明らかとなった。次に、P2X₇R を発現せずβ毒素に感受性を示さない HEK293 細胞に P2X₇R 遺伝子をトランスフェクトし、β毒素の作用を検討した (Fig. 10)。その結果、Intact 細胞、Vector-トランスフェクト細胞 (Vector-HEK293 細胞) と比較して、P2X₇R 遺伝子トランスフェクト細胞 (P2X₇R-HEK293 細胞) で P2X₇R の発現が認められた (Fig. 10A)。これらの細胞にβ毒素を作用させ、本毒素の結合を解析すると、Intact 細胞や Vector-HEK293 細胞には本毒素は結合しないが、P2X₇R-HEK293 細胞ではβ毒素の結合が認められた (Fig. 10B)。次に、細胞毒性の検討を行うと、β毒素は P2X₇R-HEK293 細胞でのみ細胞毒性を示した (Fig. 10C)。さらに、この毒性は o-ATP 処理で抑制された (Fig. 10C)。次に、P2X₇R の活性化の指標として、細胞内 Ca²⁺量の増加が知られている (68)。そこで、P2X₇R-HEK293 細胞に、Ca²⁺蛍光プローブである Fura 2-AM を取り込ませ、Positive control である P2X₇R の選択的アゴニストの Bz-ATP やβ毒素を作用させ、細胞内 Ca²⁺の測定を行った。その結果、Fig. 10D に示すように、Bz-ATP は添加後、急速に Ca²⁺の流入が起こり、その後も持続した Ca²⁺流入が認められた。一方、β毒素は、添加後、しばらくしてから Ca²⁺の流入が認められ、約 40 分でプラトーに達した。Bz-ATP とβ毒素による Ca²⁺の流入は、いずれも o-ATP の前処理で抑制された (Fig. 10D)。以上より、P2X₇R はβ毒素の作用により、作用は遅いが活性化され、P2X₇R はβ毒素の細胞毒性や結合に関与していると推察された。

第二節 β 毒素と P2X₇ レセプターの相互作用

前節の結果より、 β 毒素は、P2X₇R を特異的に認識し、細胞毒性を誘導することが明らかとなった。本節では両者の関係をさらに解析するため、両者の相互作用や細胞膜上での局在を解析した。

【実験材料および実験方法】

1) β 毒素と P2X₇R の直接相互作用の解析 [Dot-blot 法]

A) β 毒素と P2X₇R、P2X₃R、P2X₅R の結合

<実験材料>

ヒトリコンビナント P2X₇R: P2RX7 (Human) Recombinant protein (P01) [Abnova, H00005027-P01] 2 μ g (60 μ l)を 15 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注し、-80°C で保存した。使用時は、50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)で希釈し、調製した。

ヒトリコンビナント P2X₃R: P2RX3 (Human) Recombinant protein (Q01) [Abnova, H00005024-Q01] 2 μ g (60 μ l)を 15 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注し、-80°C で保存した。使用時は、50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)で希釈し、調製した。

ヒトリコンビナント P2X₅R: P2RX5 (Human) Recombinant protein (P01) [Abnova, H00005026-Q01] 2 μ g (60 μ l) を 15 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注し、-80°C で保存した。使用時は、50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で希釈し、調製した。

50% Glycerine-PBS (pH 7.4) (G-PBS) の調製: β 毒素の保存液。この実験では、 β 毒素を PVDF 膜へ作用させる際に使用した。PBS (-) (pH 7.4) 10 倍濃縮液 [Nacalaitesque, 27575-31] を蒸留水で 10 倍希釈し、オートクレーブで滅菌した。その 25 ml の滅菌 PBS (-)と、Glycerine [Nacalaitesque, 17018-83] 25 ml を混合し、使用した。4°C で保存した。

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗 β 毒素ウサギ抗体) の調製: Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体(抗ウサギ二次抗体)の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

PVDF 膜 [Millipore, ISEQ26260] を適度な大きさにカットし、Methanol で1分間親水化後、蒸留水で5分間振とうした。その後、PVDF 膜を乾燥させ、調製したヒトリコンビナント P2X₇R、P2X₃R、そして、P2X₅R を5 µl ずつ PVDF 膜上にドットし、完全に浸透するまで乾燥した。水分が無くなった PVDF 膜を、0.1% Tween 20-TBS で10分間洗浄し、Blocking One 適量を添加し、室温で、30分間インキュベーションした。ブロッキング後、0.1% Tween 20-TBS による10分間の洗浄を3回行った。G-PBS で100 ng/ml に調製したβ毒素 500 µl でパッキングし、37°C で60分間インキュベーション後、0.1% Tween 20-TBS による10分間の洗浄を3回行った。そして、調製した抗β毒素抗体 200 µl でパッキングし、37°C で60分間インキュベーション後、0.1% Tween 20-TBS による10分間の洗浄を3回行った。その後、調製した HRP 結合型二次抗体 200 µl でパッキングし、37°C で60分間インキュベーション後、0.1% Tween 20-TBS による10分間の洗浄を3回行った。最後に、第一章第一節-3) の方法に従って、LAS-4000 で解析を行った。

B) β毒素と P2X₇R の結合に対する o-ATP と PPADS の効果

<実験材料>

ヒトリコンビナント P2X₇R: P2RX7 (Human) Recombinant protein (P01) [Abnova, H00005027-P01] を、第一章第二節-1)-A) と同様の方法で調製した。

o-ATP の調製 [Sigma-Aldrich, A6779] M.W. 505.17: Adenosine 5' -triphosphate, periodate oxidized sodium salt 1.01 mg を滅菌 PBS (-) 20 µl で溶解し、100 mM とした。滅菌 PBS (-) で100倍希釈 (1 mM) し、500 µl 使用した。

PPADS の調製 [Sigma-Aldrich, P178] M.W. 599.31: Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonic acid 1.2 mg を滅菌 PBS (-) 20 µl で溶解し、100 mM とした。滅菌 PBS (-) で100倍希釈 (1 mM) し、500 µl 使用した。

50% Glycerine-PBS (pH 7.4) (G-PBS)の調製: 第一章第二節-1)-A) と同様の方法で調製した。

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗β毒素ウサギ抗体) の調製: Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体(抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

第一章第二節-1) の方法に従って、ブロッキングまでを行った。ブロッキング後、0.1% Tween 20-TBS による 10 分間の洗浄を 3 回行った。G-PBS で 100 ng/ml に調製したβ毒素 500 μl を o-ATP (濃度: 1 mM)、または、PPADS (濃度: 1 mM) 500 μl とパッキングし、37°C で 60 分間インキュベーションした。その後、第一章第二節-1) の方法に従って、解析を行った。

2) β毒素と P2X₇R の細胞膜上での局在

<実験材料>

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗β毒素ウサギ抗体) の調製: Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG を滅菌 PBS (-) で 100 倍希釈して使用した。

抗 P2X₇R 抗体の調製: Anti-P2X₇R (L-20) goat polyclonal IgG [Santa Cruz, sc-15200] を滅菌 PBS (-) で 50 倍希釈して使用した。

Alexa Fluor 568-ラベル化抗ウサギ抗体: Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG [Thermo, A-11011] を滅菌 PBS (-) で 200 倍希釈して使用した。

FITC-ラベル化抗ヤギ抗体: Anti-goat IgG-FITC [Sigma-Aldrich, F2016] を滅菌 PBS (-) で 200 倍希釈して使用した。

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、-30°C で保存した。使用時は、滅菌 PBS (-) で

100 倍希釈して使用した。

<実験方法>

細胞の調製は、第一章第一節-1) に従って行い、FBS/RPMI 1640 培地で 1×10^4 cells/well で 96 well プレートに播種して、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 30 分間馴化した。β毒素 (終濃度: $1 \mu\text{g/ml}$) を添加し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 60 分間インキュベーションした。毒素処理後、細胞を 1.5 ml チューブに回収し、室温で 2,000 rpm、5 分間遠心した。上清を除去後、室温の滅菌 PBS (-) を 300 μl 添加し、懸濁した。この細胞懸濁液は以下の通りに作業を行い、サイトスピン 4 [Thermo Scientific™, A78300003] で、スライドに吸着させた。サイトスピン 4 からシールドヘッド [Thermo Scientific™, 59940018] を取り出し、蓋を外した。そして、シングルサイトスライド [Thermo Scientific™, 599105] のサークルと、シングルホワイトサイトフューNELス [Thermo Scientific™, 599104] のフィルターガード面の集細胞エリアを重ね合わせ、サイトクリップ [Thermo Scientific™, 59910052] に固定した。調製した細胞懸濁液を、シングルホワイトフューNELスの口から添加し、スライドや、フィルターガードに細胞懸濁液が付着しないようシールドヘッドに装着し、蓋をした。その後、サイトスピン 4 にシールドヘッドを装着し、500 rpm で 5 分間遠心を行い、細胞をスライドへ吸着させた。遠心後は、直ぐにサイトスピン 4 からシールドヘッドを取り外し、蓋を取り、慎重にサイトクリップを取り出した。その後、スライドとシングルホワイトフューNELスを取り外し、スライドを適度に振って乾燥させ、吸着した細胞集団がひび割れないようにし、ある程度乾いたら、一晩しっかり乾燥させた。翌日、 -30°C の Methanol で -30°C の条件下で 10 分間固定を行った。その後、 -30°C の Acetone で -30°C の条件下で 1 分間透過処理を行った。そして、スライドを乾燥させ、Blocking One histo [Nacalai tesque, 06349-64] を 2 滴滴下し、保湿チャンバー内で、室温で 30 分間インキュベーションした。滅菌 PBS (-) で 2 回洗浄後、調製した一次抗体を 50 μl 添加し、保湿チャンバー内で、室温で 60 分間インキュベーションした。滅菌 PBS (-) で 2 回洗浄後、調製した二次抗体を 50 μl 添加し、保湿チャンバー内で、室温で 60 分間インキュベーションした。滅菌 PBS (-) で 2 回洗浄後、Hoechst 33342 を滅菌 PBS (-) で 100 倍希釈したものを 50 μl 添加し、室温で 10 分

間処理した。処理後、フルオロキーパー [Nacalai tesque, 12593-64] を1滴滴下し、カバーガラス [Matsunami, C024501] をかけ、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。

3) 脂質ラフトにおけるβ毒素と P2X₇R の局在

<実験材料>

1% Triton X-100-25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)-150 mM NaCl-5 mM EDTA (TNE-buffer) の調製: 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 62.5 ml に NaCl 4.4 g と Triton X-100 5.0 ml と 500 mM EDTA (pH 8.0) 5.0 ml 加え、蒸留水で全量を 500 ml とした。

Protease inhibitor cocktail EDTA free (100×) の調製 [Nacalai tesque, 03969-21]: Protease inhibitor cocktail EDTA free を滅菌蒸留水 1.0 ml で溶解した。使用時は、液量に対して 100 倍希釈となるよう添加し、使用した。

TNE-PI buffer の調製: TNE buffer 20 ml に、溶解した Protease inhibitor cocktail EDTA free を 200 μl 添加し使用した (用時調製)。

80% Sucrose 溶液の調製: Sucrose [Nacalai tesque, 30404-45] 80 g に TNE buffer を適量加え、加温して溶解後、100 ml とした。

36% Sucrose 溶液の調製: Sucrose 36 g を TNE buffer で溶解し、全量を 100 ml とした。

5% Sucrose 溶液の調製: Sucrose 5 g を TNE buffer で溶解し、全量を 100 ml とした。

20% TCA の調製: Trichloroacetic Acid [Nacalai tesque, 34603-15] 20 g を滅菌蒸留水 100 ml に溶解した。

HBSS (-) without Ca²⁺, Mg²⁺ and Phenol Red, liquid [Nacalai teque, 17461-05]

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗β毒素ウサギ抗体) の調製: Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

抗 P2X₇R 抗体の調製: Anti-P2X₇R (H-265) rabbit polyclonal IgG [Santa Cruz, sc-25698] を第一章第一節-4)-B) と同様の方法で調製した。

抗 Caveolin-1 ウサギ抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 19 ml を大試験管に加え、Anti-Caveolin-1 mouse polyclonal IgG [Becton Dickinson, 610406] 1 µl と Blocking One 1.0 ml を添加し、4°C で保存した。使用時は、この液をそのままプラスチック容器に添加し、振とうした。

HRP 結合型抗ウサギ抗体(抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、3.5 cm シャーレに 5×10^6 cells/3.0 ml (FBS/RPMI 1640 培地) で THP-1 細胞を播種した。37°C で 30 分間馴化を行った後、β毒素 (終濃度: 1 µg/ml) を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションした。その後、細胞を回収し、滅菌 PBS (-) 10 ml で洗浄し、室温で 1,500 rpm、5 分間遠心後、上清を取り除き、沈渣に TNE-PI buffer を加え、全量 1.0 ml とした。その後、5 分間、超音波処理 [コスモバイオ, UCD-200T] を行い、等量の 80% スクロース溶液 (1.0 ml) を加え、vortex し均一にした後、超遠心チューブ [Beckman, 328874] に泡が入らないよう慎重に 400 µl をマイクロピペットで移した。その上に、36% スクロース溶液 2.4 ml を界面が乱れないように器壁に沿ってゆっくりと重層した。さらに、その上に 5% スクロース溶液 1.2 ml を同じ方法で重層した。そのチューブを SW60Ti [Beckman] ローターにセットし、Optima™ XL-A [Beckman] で 4°C で、35,000 rpm、16 時間超遠心を行った。超遠心後、遠心チューブの上層から 0.4 ml ずつ 1.5 ml チューブに分画し、20% TCA を 0.4 ml ずつ添加して、vortex 後、4°C で 1 時間インキュベーションした。その後、4°C、15,000 rpm で 20 分間遠心し、上清除去後、各 1.5 ml チューブに Acetone 500 µl を添加し、vortex 後、4°C、15,000 rpm で 20 分間遠心した (2 回)。Acetone で洗浄後、サンプルを乾燥させ SDS sample buffer 40 µl を加え、1 分間超音波処理後、37°C で 2 時間インキュベーションした。その後、1% coomassie blue を少量添加し 10% Real gel plate [Gellax, SDB-521] に

20 μ l ずつアプライした。555 V, 30 mA で1時間、SDS-PAGE を行った。この後、第一章第一節-3) の方法に従って、Western blotting を行い、LAS-4000 で解析した。

<実験成績>

第二節では、ウエルシュ菌β毒素と P2X₇R 間の相互作用、および、細胞膜上での局在について検討を行った。まず、P2X₇R のヒトリコンピナントタンパク質を使用し、β毒素の結合を Dot-blot 法で検討した。Fig.11A に示すように、P2X₇R をドットした PVDF 膜とβ毒素をインキュベーションすると、ドットした P2X₇R 量に依存して、β毒素と P2X₇R の結合が認められた。そこで、β毒素の P2X₇R に対する特異性を検討するため P2X₃R と P2X₅R を使用し、これらの P2XR に対するβ毒素の結合を観察した。その結果、本毒素は P2X₇R に結合するが、P2X₃R や P2X₅R には結合しなかった (Fig. 11B)。さらに、β毒素と P2X₇R の結合は、 α -ATP や PPADS の存在下で抑制された (Fig. 11C)。すなわち、β毒素は P2X₇R と特異的に結合することが判明した。次に、β毒素と P2X₇R の細胞膜上での局在を免疫蛍光染色法を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Fig. 11D, E に示すように、THP-1 細胞とβ毒素をインキュベーションすると、β毒素の赤色は、細胞内に侵入せず、細胞膜上で認められた。一方、P2X₇R の緑色は細胞膜全体に点状に存在した。両者のマージは黄色で示され、拡大図で、共局在が認められるが、単独でも存在し、マージをカウントすると、約 40%程度の共局在率を示した。このβ毒素の細胞膜への結合は、 α -ATP や PPADS の存在下で抑制された (Fig. 11D)。次に、β毒素と THP-1 細胞をインキュベーション後、細胞を 1% Triton X-100 中で 4°C 条件下でホモジナイズし、スクロース密度勾配超遠心法で脂質ラフトを分画し、β毒素と P2X₇R の局在を解析した。今回の条件では、Fig. 11F に示すように、レーン 3~6 に脂質ラフトのマーカーである Caveolin-1 が認められ、これらの画分が脂質ラフトであることが判明した。β毒素はレーン 3~5 にオリゴマーが認められ、P2X₇R もレーン 3~5 に多く存在することが判明した。すなわち、両者は、共に脂質ラフトに局在することが明らかとなった。

以上より、β毒素は P2X₇R と相互作用し、毒素の一部は細胞膜上で P2X₇R と結合していることが明らかとなった。

第三節 β 毒素のマウス致死作用における P2X₇レセプターの役割

前節の結果より、 β 毒素は、細胞膜上の脂質ラフトに存在する P2X₇R を介して、細胞毒性を誘導することが明らかとなった。本節では、 β 毒素の治療に P2X₇R がターゲットとなるかどうかを明らかにするため、*in vivo* において、P2X₇R 阻害剤が β 毒素の毒性に影響を与えるかどうかを検討した。そこで、 β 毒素のマウス致死活性における P2X₇R の役割を解明するため、P2X₇R 選択的阻害剤である BBG をマウスに前投与し、これに β 毒素を投与し、本毒素のマウス致死活性に対する効果を検討した。

1) β 毒素のマウス致死活性における P2X₇R の役割

A) β 毒素の致死活性に対する種々の薬物の効果

<実験材料>

ICR マウス: ICR マウス [オス、4 週齢] は、日本 SLC より購入した。

BBG の調製 [東京化成, 6104-58-1] M.W. 854.02: Brilliant blue G を滅菌 PBS (-) で溶解し、25 mg/kg の濃度に調製し、0.1 ml を投与した。

<実験方法>

1 群 10 匹の ICR マウスに、コントロールとして滅菌 PBS (-) 0.1 ml、そして、P2X₇R 阻害剤である BBG (25 mg/kg) を 0.1 ml 腹腔内投与し、2 時間後に、 β 毒素を 250 ng/0.1 ml 腹腔内投与した。投与後は、1 時間毎に、マウスを観察した。

<実験成績>

第三節では、本毒素のマウス致死活性における P2X₇R 阻害剤の効果を検討した。生理食塩水、および、BBG を二時間前にマウス腹腔内投与し、その後、β毒素を投与してマウスの致死時間を観察した。その結果、生理食塩水と毒素投与では投与後約 10 時間で、全てのマウスが死亡した (Fig. 12)。これに対して、BBG 投与マウスにおいて、β毒素を投与しても、約 30 時間が経過しても 50%のマウスの生存が観察された。すなわち、P2X₇R 阻害剤はβ毒素のマウス致死活性を阻害することが判明した。

第四節 考察および小括

<考察>

C 型ウエルシュ菌β毒素は、ヒトやブタなどの家畜において、壊疽性腸炎を引き起こす病原因子の一つと考えられている (11, 14, 16)。これまで、β毒素の作用メカニズムの検討は、動物に対する作用や細胞毒性など、様々な報告がある (45, 48, 52, 54)。著者は、C 型菌感染症の治療法を確立するため、主要病原因子であるβ毒素の作用メカニズムの解明を行った。まず、未だ同定されていない本毒素のレセプターの探索を試みた。本毒素の細胞感受性や他のβ-PFT の結果、そして、今回の検討から、本毒素のレセプターが、P2X₇R であることを明らかにした。

β毒素と同じβ-PFT ファミリーに属する *E. coli* α-hemolysin (64)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin (69)、*S. aureus* α-toxin (61) は P2X₇R シグナルを介して細胞毒性を示すことが報告されている。さらに、β毒素が感受性を示す免疫系の細胞には P2XR が豊富に存在する (67)。以上の知見より、β毒素と P2XR の関係を検討するため、非選択的 P2XR 阻害剤である Suramin や PPADS のβ毒素の細胞毒性に対する作用を検討したところ、本毒素の細胞毒性は抑制された。そこで、P2X₇R 選択阻害剤である α-ATP、α-ADP、または、BBG の処理により、本毒素の細胞毒性が著しく抑制された。さらに、阻害作用の強い α-ATP は、β毒素の細胞への結合を抑制した。以上から、本毒素の作用に P2X₇R が関与することが強く示唆された。そこで、本毒素の作用における P2X₇R の役割を明らかにするため、P2X₇R の siRNA を THP-1 細胞へトランスフェクトし、P2X₇R をノックダウンした細胞を作製し検討したところ、本毒素の結合と細胞毒性は著しく減少した。すなわち、P2X₇R が本毒素の細胞への結合や毒性発現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、β毒素と P2X₇R の直接的な結合を Dot-blot 法で検討すると、β毒素は P2X₇R と結合した。一方、他の P2XR ファミリーである P2X₃R や P2X₅R とは本毒素は結合しなかった。さらに、細胞膜上でβ毒素と P2X₇R は、約 40%の共局在率を示した。以上から、β毒素と P2X₇R は直接、そして、特異的に結合することが判明した。所属する研究室

では、 β 毒素が脂質ラフトでオリゴマーを形成して細胞毒性を示すことを報告した(57)。また、他の β -PFTも脂質ラフトに結合し、オリゴマーを形成して細胞障害を示すことが報告されており(70-73)、脂質ラフトは β -PFTの毒性発現において重要な足場であると考えられている。今回の検討で、 β 毒素とP2X₇RがTHP-1細胞の脂質ラフトに存在することを明らかにした。以上の結果より、 β 毒素はモノマーで脂質ラフトのP2X₇Rに結合し、オリゴマーを形成することが判明した。

P2RはP2XRとP2YRの2つのサブタイプに分けられる。P2YRはGタンパク結合型レセプターで、THP-1細胞にはP2Y₂R、P2Y₆R、そして、P2Y₇Rの発現が確認されている(74)。P2Y₂RとP2Y₆RはIL-8や他のケモカインの遊離に関わっていることが報告されている(74)。今回、著者はP2Y₂RとP2Y₆Rのノックダウンを行い検討したが、これらのレセプターは、本毒素の細胞毒性に関与しないことが明らかとなった。すなわち、本毒素の作用はP2X₇Rに特異的であると考えられる。

β 毒素は、前述のようにP2X₇Rと直接結合するので、本毒素は感受性細胞のレセプターとしてP2X₇Rを利用していると考えられる。P2X₇Rを強制発現させたP2X₇R-HEK293細胞に対して、 β 毒素はオリゴマーを形成し、細胞毒性を示した。一方、Intact-HEK293細胞に対しては、これらの作用は示さない。さらに、P2X₇RはATPやBz-ATPなどのアゴニストで処理すると、一価と二価のカチオンが透過するチャネルを形成することが知られている(75)。そこで、P2X₇Rを発現させたP2X₇R-HEK293細胞に、Bz-ATPを作用させると、急速なCa²⁺の流入が惹起された。一方、 β 毒素はP2X₇R-HEK293細胞に対して、作用は遅いが、時間と共にCa²⁺の流入を促進した。以上より、本毒素はP2X₇Rに結合後、形成されたオリゴマーのポアから、または、P2X₇Rの活性化によって、Ca²⁺の流入を促進すると考えられる。

Staturkyらは、 β 毒素はホスファチジルコリン(DOPC)とコレステロール(Chol)で構成されるリポソームに結合し、カチオン選択性のポアを形成することを報告している(57)。Nagahamaらは、高濃度の β 毒素がDOPC-Cholリポソームからカルボキシフルオレセイン(CF)を遊離させることを報告している(57)。このように、本毒素は、タンパク質性のレセプター以外に細胞膜リン脂質と相互作用していることが推察され、細胞膜の脂質環境が本毒素の結合に影響していると考えられる。 β 毒素と同

β-PFT ファミリーの *S. aureus* α-toxin は、細胞膜上に存在するメタロプロテアーゼである A-disintegrin-and-metalloproteinase 10 (ADAM10) がレセプターの一つとして報告された (58, 59)。ADAM10 はメタロプロテアーゼ活性により、E-cadherin や ephrinA5 等の細胞膜タンパク質を切断する (59, 76)。一方、α-toxin が ADAM10 のいずれの部位に結合するかは未だ明らかになっていない。また、α-toxin は細胞膜レセプターに結合後、P2XR のシグナルを介して、溶血を誘導することが報告されている。さらに、スフィンゴミエリン (SM) の頭部のホスホコリンは、SM と Chol から成るマイクロドメインでクラスター化し、α-toxin のレセプターとして働くことが報告され (77)、α-toxin は、細胞膜リン脂質を認識することが報告されている (77)。このように、ADAM10 などのタンパク質性分子と細胞膜脂質などの複数の因子が α-toxin の結合に関与することが考えられている。ウエルシュ菌β毒素は *S. aureus* α-toxin と性質が類似していることやリポソームの脂質二重膜を破壊することから、本毒素もタンパク質性のレセプターと細胞膜脂質を認識して結合すると推察される。

P2X₇R は全身にユビキタスに発現している (75) が、特に免疫系の細胞に多く発現している (67)。これら免疫系細胞は、本毒素に高い感受性を示す (78)。さらに、P2X₇R を高発現する免疫系細胞が微生物感染時の早期に防御に働くことが報告されている (79)。細胞外の ATP により P2X₇R が活性化されると、細胞内 K⁺の流出、細胞外 Na⁺、Ca²⁺の流入が起こり、細胞が急速に脱分極する。さらに、P2X₇R の活性化により、(i) IL-1βや IL-18 の産生を誘導するインフラマソームの活性化、(ii) ストレス応答性プロテインキナーゼの活性化、(iii) Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) の活性化等様々な細胞応答が生じることが報告されている (75)。免疫系細胞では、P2X₇R の活性化により自然免疫系の活性化や炎症反応が起こることが報告されているが (75)、一方で、ATP による持続的な P2X₇R の刺激で、免疫系細胞がネクローシスやアポトーシスが誘導されることも報告されている (75)。病原性細菌として知られる *Streptococcus* 属菌や *Legionella* 属菌は宿主細胞のアポトーシスを誘導し、免疫系細胞を減少させ、生存環境を整えることも報告されている (79)。このように、β毒素が P2X₇R を活性化することで、腸管の免疫系細胞の細胞死を誘導し、C 型菌は自然免疫システムから回避していると考えられる。

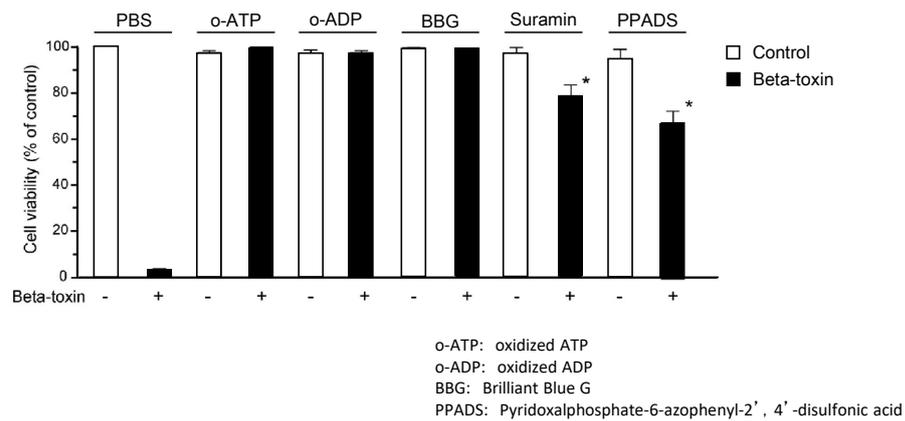
β 毒素はC型菌感染症の壊疽性腸炎の主要病原因子である。腸管上皮細胞や、腸管神経にはP2X₇Rが発現しており、P2X₇Rが活性化すると、サイトカインやケモカインの遊離、腸管粘膜の炎症や神経細胞死を起こすことが報告されている(80)。これまでに、 β 毒素は腸管の血管内皮細胞に作用してオリゴマーを形成し、細胞死を誘導することが報告されている(48, 49)。すなわち、腸管粘膜や神経、そして、血管内皮細胞でのP2X₇Rと β 毒素の相互作用が、C型菌の壊疽性腸炎の病原性発現に関与していると推察される。今回の結果から、P2X₇Rの選択的阻害剤であるBBGが本毒素の致死作用を抑制したことから、P2X₇R阻害剤が、C型菌感染症における壊疽性腸炎の新たな治療薬の一つになることが期待される。

<小括>

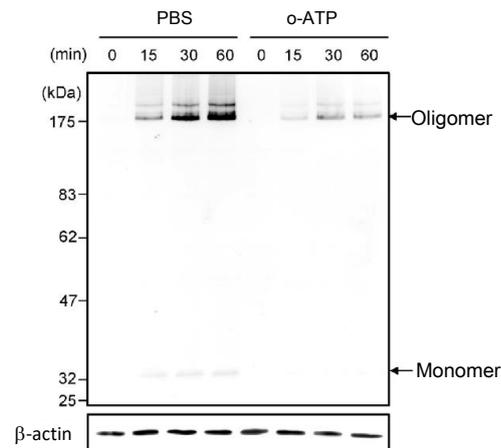
ウエルシュ菌 β 毒素は、感受性細胞において、P2X₇Rを介して細胞に結合して作用することが明らかになった。今後、P2X₇Rが本毒素の結合に対してどのように働いているかを検討することによりP2X₇R阻害剤が、C型菌感染症の治療に応用できる可能性が期待される。

Fig. 7 Effects of P2 receptor antagonists on the cytotoxicity and binding of the toxin in THP-1 cells treated with beta-toxin.

(A)

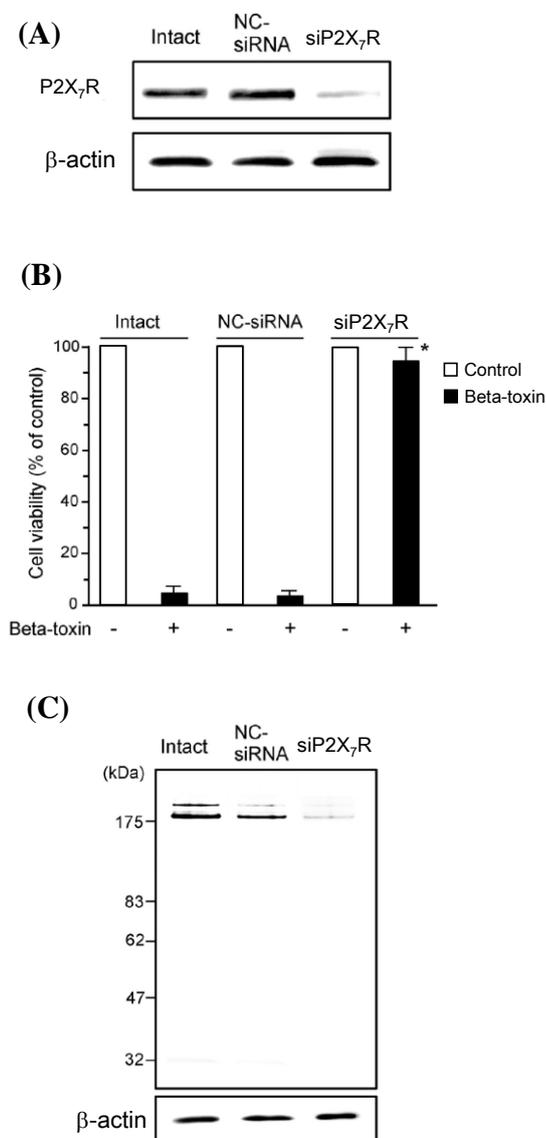


(B)



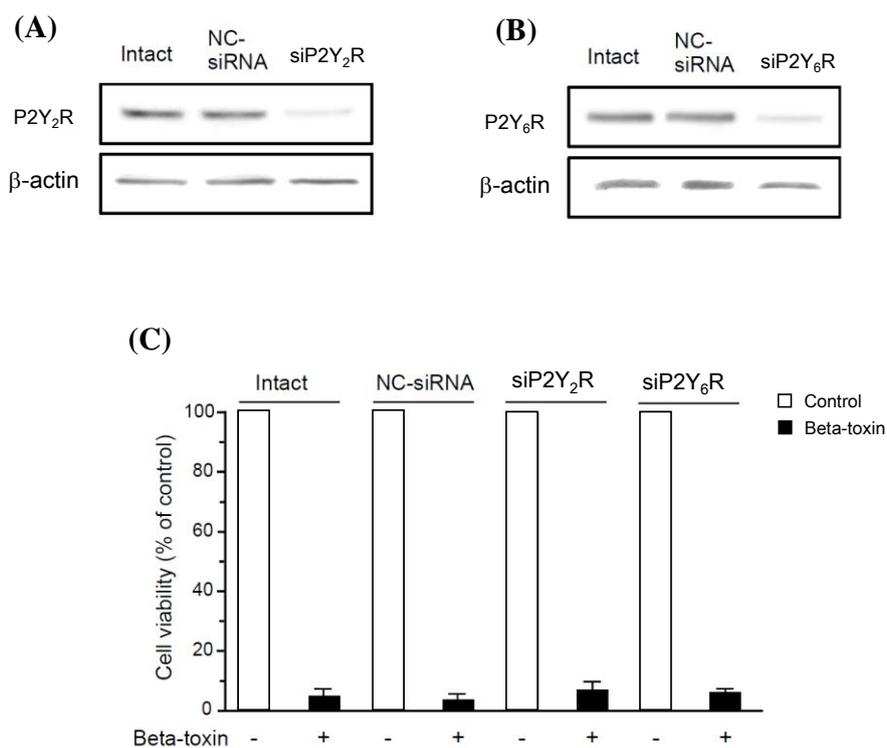
(A) THP-1 cells treated with PBS (vehicle), 500 μ M o-ATP, 500 μ M o-ADP, 3 μ M BBG, 100 μ M suramin or 250 μ M PPADS at 37°C for 60 min were then treated with beta-toxin (0.5 μ g/ml) at 37°C for 4 h. Cell viability was determined by the MTS assay. Data are reported as percentages of the values obtained with untreated controls (mean \pm SD for four independent experiments). Significant differences (Student's *t*-test) from control cells are indicated. **P* < 0.001, significantly different from PBS plus beta-toxin. (B) THP-1 cells treated with PBS (vehicle) or 500 μ M o-ATP at 37°C for 60 min were treated with beta-toxin (0.5 μ g/ml) at 37°C for the indicated time periods. After washing with PBS, cells were subsequently lysed, and beta-toxin and β -actin (control) were detected by western blotting using specific antibodies. A typical result from one of three experiments is shown.

Fig. 8 Effects of siRNA for the P2X₇ receptor on cytotoxicity and binding of the toxin in THP-1 cells treated with beta-toxin.



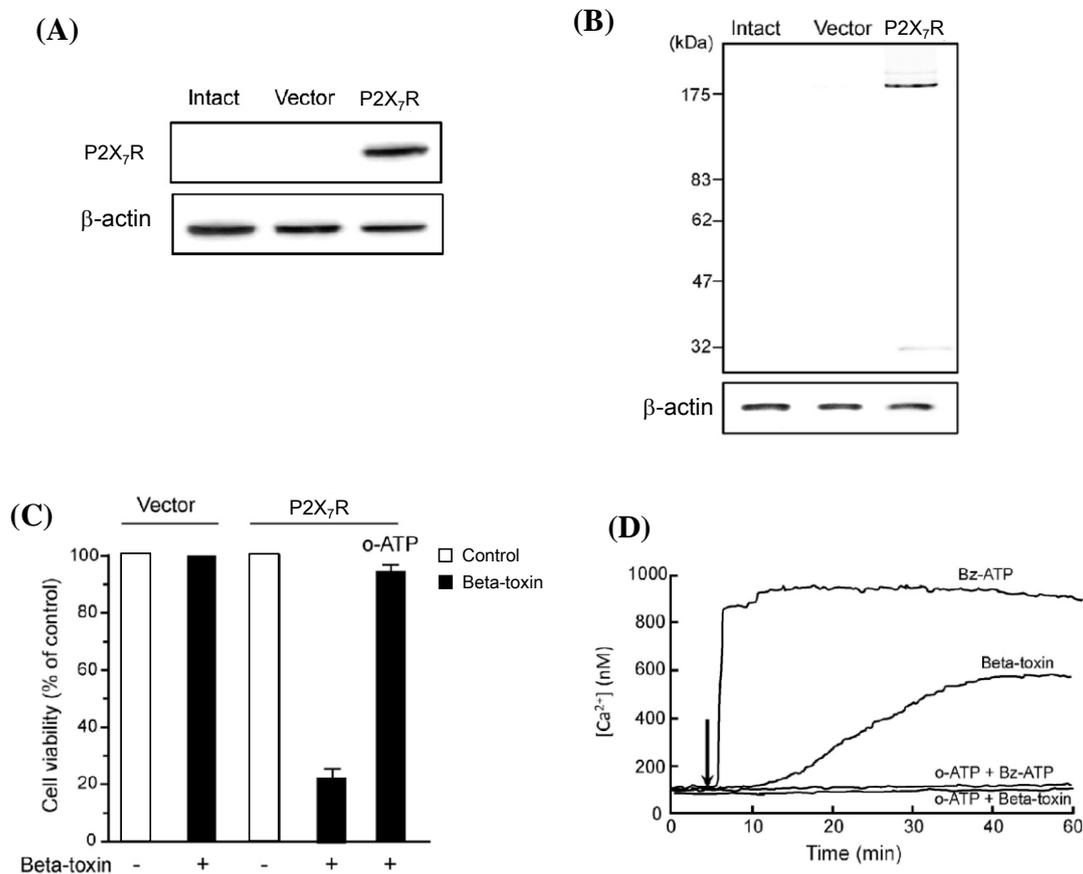
THP-1 cells were transfected with siP2X₇R or negative control (NC)-siRNA and cultured for 48 h at 37°C and 5% CO₂. (A) The expression of the P2X₇R in cells treated with siRNA was detected by Western blotting using an anti-P2X₇R antibody and anti-β-actin antibody. (B) Intact cells, NC-siRNA-treated cells, or siP2X₇R-treated cells were incubated with beta-toxin (0.5 μg/ml) at 37°C for 4 h. Cell viability was determined via the MTS assay. Data are reported as percentages of the values obtained with untreated controls (mean ± SD for four independent experiments). Significant differences (Student's t-test) from control cells are indicated. *P < 0.001, significantly different from NC-siRNA-treated cells plus beta-toxin. (C) These siRNA-treated cells were incubated with beta-toxin (0.5 μg/ml) at 37°C for 30 min. After washing with PBS, cells were subsequently lysed, and beta-toxin and β-actin (control) were detected by Western blotting using specific antibodies. A typical result from one of three experiments is shown.

Fig. 9 Effects of siRNA for the P2Y₂ or P2Y₆ receptor on the cytotoxicity of the toxin in THP-1 cells treated with beta-toxin.



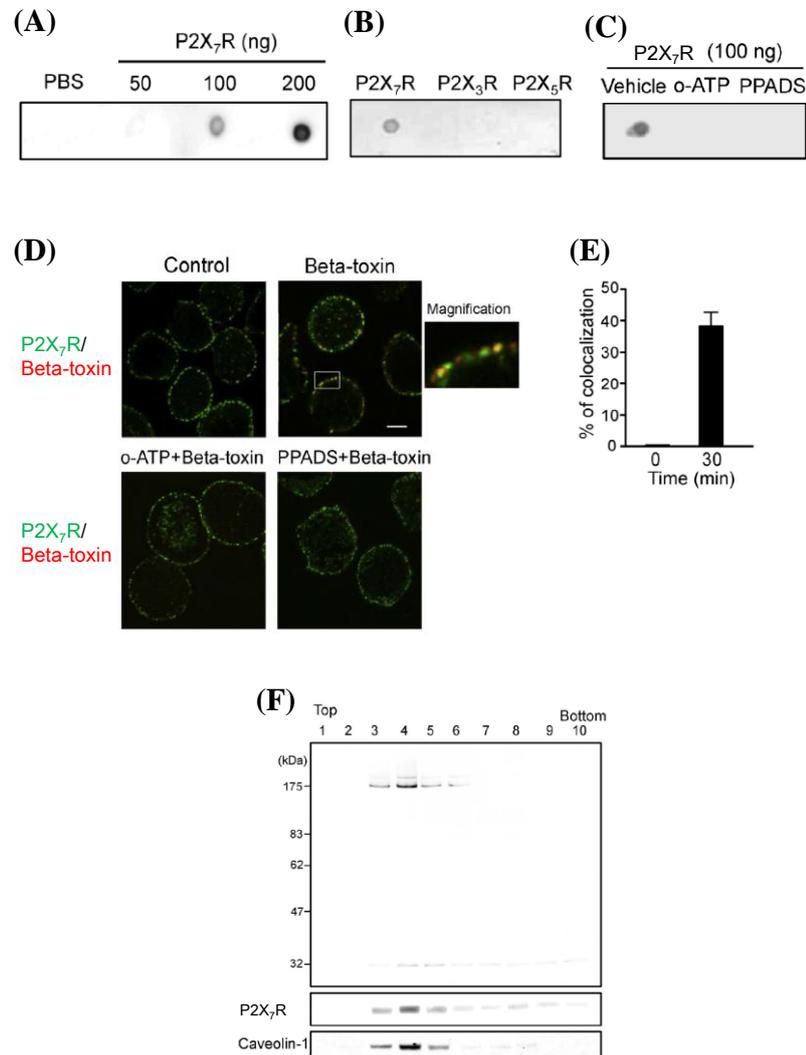
THP-1 cells were transfected with siP2Y₂R, siP2Y₆R, or NC-siRNA. The expression of the P2Y₂R (A) or P2Y₆R (B) in cells treated with siRNA was detected by Western blotting using an anti-P2Y₂R antibody, anti-P2Y₆R antibody, and anti-β-actin antibody. Typical results from one of four experiments are shown. (C) siRNA-treated cells were incubated with beta-toxin (0.5 μg/ml) at 37°C for 4 h. Cell viability was determined via an assay with MTS. Data are reported as percentages of the values obtained with untreated controls (mean ± SD for four independent experiments).

Fig. 10 Action of beta-toxin on P2X₇R-expressing HEK293 cells.



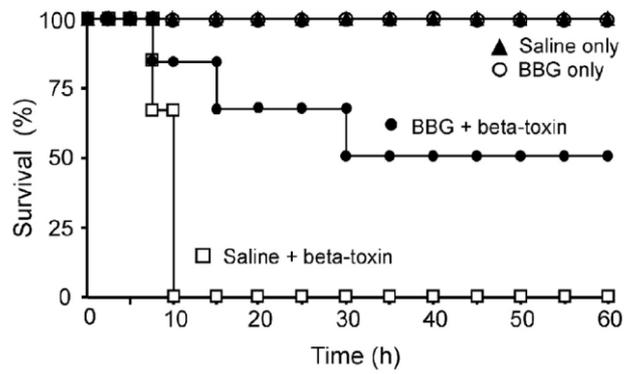
(A) HEK293 cells were transiently transfected with pcDNA-P2X₇R (P2X₇R-HEK293) and pcDNA (vector-HEK293). After being incubated for 24 h, the expression of the P2X₇R in the transfected or intact cells was detected by Western blotting using an anti-P2X₇R antibody. Typical results from one of four experiments are shown. (B) P2X₇R-HEK293 cells, vector-HEK293 cells, and intact cells were incubated with beta-toxin (0.5 μ g/ml) at 37°C for 30 min. After washing with PBS, cells were subsequently lysed, and beta-toxin and β -actin (control) were detected by Western blotting using specific antibodies. A typical result from one of four experiments is shown. (C) P2X₇R-HEK293 cells and vector-HEK293 cells were incubated with PBS or 0.5 mM o-ATP at 37°C for 1 h. The cells were treated with beta-toxin (0.5 μ g/ml) at 37°C for 4 h. Cell viability was determined via an assay with MTS. Data are reported as percentages of the values obtained with untreated controls (mean \pm SD for four independent experiments). (D) Fura 2-AM loaded P2X₇R-HEK293 cells treated with vehicle (PBS) or 500 μ M o-ATP at 37°C for 60 min were treated with 100 μ M Bz-ATP or beta-toxin (1 μ g/ml) at 37°C. Beta-toxin and Bz-ATP were added at the time indicated by the arrow. The experiments were conducted >10 times, and typical results are shown.

Fig. 11 Interaction between beta-toxin and the P2X₇ receptor.



Interaction between beta-toxin and the P2X₇R. (A) Dot-blot analysis of the interaction between beta-toxin and the P2X₇R. The purified protein P2X₇R (50, 100 and 200 ng) was applied to a PVDF membrane. (B) The purified protein P2X₇R (100 ng), purified protein P2X₃R (200 ng), and purified protein P2X₅R (200 ng) were applied to a PVDF membrane. The membrane was blocked, and subsequently incubated with beta-toxin (100 ng/ml). (C) Competition dot blot assay. Purified P2X₇R (100 ng) was spotted onto PVDF membrane and blocked, and subsequently incubated with beta-toxin in the presence of 0.5 mM o-ATP and 0.5 mM PPADS. After washing, the membranes were incubated with an anti-beta-toxin antibody and secondary peroxidase-coupled antibody to detect bound beta-toxin by the ECL reaction. Typical results from one of four experiments are shown. (D) Colocalization of beta-toxin and the P2X₇R. THP-1 cells were incubated with beta-toxin (1 µg/ml). Unintoxicated cells were used as a control. For experiments with the inhibitors, THP-1 cells were preincubated with 0.5 mM o-ATP or 250 µM PPADS at 37°C for 60 min. All cells were fixed and subjected to immunostaining for the P2X₇R with a goat P2X₇R antibody and beta-toxin with a rabbit anti-beta-toxin antibody. Confocal images are shown with green signals indicating P2X₇R and red signals indicating beta-toxin. The yellow color indicates the colocalization of beta-toxin and the P2X₇R. The experiments were repeated three times, and a representative result is shown. The scale bar represents 10 µm. A magnified image of the boxed area is shown on the right. (E) Quantification of colocalization. Quantitative analysis of beta-toxin/P2X₇R colocalization was performed using ImageJ software. The percent of colocalization was calculated for each combination of fluorescence markers by analysis of each confocal plane. The results represent the mean ± SD of several cells (n>20) obtained from at least three independent experiments. (F) THP-1 cells were incubated with beta-toxin (1 µg/ml) at 37°C for 30 min. Triton X-100-insoluble cell extracts were subjected to SDS-PAGE. Fractions containing lipid rafts were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using an anti-beta-toxin antibody, anti-P2X₇R antibody, or anti-Caveolin-1 antibody. A typical result from one of three experiments is shown.

Fig. 12 Effect of Brilliant Blue G on lethality induced by beta-toxin.



Mice received BBG (25 mg/kg) i.p. 2 h before the i.p. injection of beta-toxin (250 ng/mouse). Survival of the mice was monitored every 2 or 5 h after the injection of the toxin. A typical result from one of five experiments is shown (n= 10).

第二章 ウエルシュ菌β毒素の細胞毒性に関与するシグナルの解明

ウエルシュ菌β毒素は、P2X₇R に結合し細胞毒性を示すことを明らかにした。P2X₇R は下流に存在する ATP 遊離チャネルである Pannexin1 (Pannx1) と共役し、P2X₇R のシグナル伝達に関与することが報告されている (81, 82)。Pannx1 は P2X₇R と同様に、ATP シグナルに関与していることから、本毒素の毒性発現における Pannx1 の役割を検討した。

Pannx1 は 4 回膜貫通型と予想される膜タンパク質で (83)、細胞外の ATP が ATP レセプターである P2XR に結合すると活性化され、何らかのシグナルを介して Pannx1 は刺激を受け、6 量体のチャネルを形成し活性化する (84)。活性化した Pannx1 は細胞内の ATP を細胞外へ遊離し、遊離した ATP が次のシグナル分子となり P2XR を刺激して様々な生理作用を誘導するというサイクルが知られている (85, 86)。この他に Pannx1 の活性化機構として、細胞内 Ca²⁺上昇による活性化、カスパーゼによる Pannx1 の C 末端領域の切断による不可逆的活性化、そして、高浸透圧、虚血 (低酸素状態)、または、機械的刺激などの細胞ストレスによる活性化が知られている (84-86)。一方、P2X₇R と Pannx1 はヘテロオリゴマーとなり、その後、巨大なポアを形成し、膜透過性を亢進するという報告がある (82)。しかしながら、現在まで、P2X₇R からの刺激による Pannx1 の正確な活性化機構は不明である。β毒素と同じβ-PFT ファミリーの *E. coli* α-hemolysin は、P2X₇R や Pannx1 を介して作用を示すが、細胞膜上で形成した毒素のポアからも、細胞内 ATP を細胞外へ遊離すると報告された (87)。このように、細胞にβ-PFT が作用すると、細胞内 ATP は毒素のポア、Pannx1 チャネル、または、それら両方から遊離するが、その後、遊離した ATP が毒素の活性にどのような影響を与えるかは報告されていない。一方、Pannx1 は大腸の炎症性疾患 (IBD) に関わり、腸管の炎症に関与することも報告されている (88, 89)。本章では、β毒素は壊疽性腸炎の原因であること、そして、β毒素は P2X₇R に結合することから、P2X₇R と密接に相互作用する Pannx1 が本毒素の細胞毒性シグナルに関与するかどうかを解析した。

第一節 β 毒素の細胞毒性と Pannexin1 シグナルの関係

β 毒素は、宿主細胞の P2X₇R に結合後、細胞毒性を惹起することを明らかにした。第一節では、P2X₇R の共役分子で ATP 遊離チャネルである Panx1 が本毒素の細胞毒性にどのような役割を演じているかを検討した。

【実験材料および実験方法】

1) Pannexin1 阻害剤の β 毒素の細胞毒性に対する効果

<実験材料>

CBX の調製 [Sigma-Aldrich, C4790] M.W. 614.72: Carbenoxolone disodium salt 1.84 mg を滅菌 PBS (-) 30 μ l で溶解し、100 mM とした。細胞処理時に滅菌 PBS (-) で 100 倍希釈 (1 mM) し、希釈液を培地 100 μ l に対して 2 μ l 添加した (終濃度: 20 μ M)。

Pb の調製 [東京化成, P1975] M.W. 285.36: Probenecid 2.0 mg を DMSO 140 μ l で溶解し、50 mM とした。細胞処理時に、100 μ l に対して 2 μ l 添加した (終濃度: 1 mM)。

sc-¹⁰Panx1 の調製 [Tocris, 3708] M.W. 1242.37: Scrambled-¹⁰Panx1 1.0 mg を滅菌蒸留水 500 μ l で溶解し、1.6 mM とした。細胞処理時に培地 90 μ l に対して 12.5 μ l 添加した (終濃度: 200 μ M)。

¹⁰Panx1 の調製 [Tocris, 3348] M.W. 1242.37: ¹⁰Panx1 1.0 mg を滅菌蒸留水 500 μ l で溶解し、1.6 mM とした。細胞処理時に培地 90 μ l に対して 12.5 μ l 添加した (終濃度: 200 μ M)。

※ 溶解した阻害剤とペプチドは、全て-30°C で保存した。

Cell Counting Kit-8 (MTS 試薬): 第一章第一節-2) に示した。

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、96 well プレートに THP-1 細胞を 1 \times 10⁵ cells/100 μ l/well (FBS/RPMI 1640 培地) で播種し、Negative control には Vehicle として DMSO を添加し、阻害剤の終濃度は 10 と 20 μ M CBX、1 mM Pb、

200 μM sc-10Pannx1、100 と 200 μM ¹⁰Pannx1 で細胞を処理し、37°C、5% CO₂ の条件下で1時間インキュベーションした。その後、 β 毒素（終濃度： 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下でインキュベーションした。細胞生存率の測定は、第一章第一節-2) の方法に従って MTS 法で解析した。

2) Pannx1 ノックダウン THP-1 細胞に対する β 毒素の結合や細胞毒性

A) siRNA のトランスフェクション法

Pannx1 siRNA の調製 [Qiagen, 1027416]: Hs Pannx1_5 [Qiagen, SI-03156307]、Hs Pannx1_6 [Qiagen, SI-04147626]、Hs Pannx1_7 [Qiagen, SI-04162760]、Hs Pannx1_8 [Qiagen, SI-04177712] の各々の siRNA (1 nmol) 粉末を付属の H₂O 100 μl で溶解した（濃度： 10 μM ）。調製液は 5 μl ずつ分注し、-30°C で保存した。

Negative control siRNA の調製: AllStars Negative control siRNA を第一章第一節-4)-A) と同様の方法で調製した。

種々の siRNA をデータシート記載の細胞数に対して、2.5 μl ずつ（合計： 10 μl 、各々の siRNA の終濃度： 250 nM）を添加し、Neon™ Transfection System を用いてエレクトロポレーションを行った。Negative control siRNA は、2.5 μl 添加（終濃度： 500 nM）し、エレクトロポレーションを行った。

Neon™ Transfection System 100 μL Kit

Neon™ Transfection System

<実験方法>

ノックダウン細胞の調製は、第一章第一節-4)-A) に従って行った。

B) Pannx1 のノックダウンの確認法

<実験材料>

使用した抗体

抗 Pannx1 抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 19 ml を大試験管に加え、Anti-Pannexin1 (K-20) goat polyclonal IgG [Santa Cruz, sc-49695] 20 μl と

Blocking One 1.0 ml を添加し、懸濁後、4°C で保存した。使用時は、この液をそのままプラスチック容器に添加し、振とうした。使用後は、この液を回収し、4°C で保存した。[3 週間の保存期間で、複数回使用できる。]

HRP 結合型抗ヤギ抗体 (抗ヤギ二次抗体) の調製: 0.1% Tween 20-TBS 19 ml を大試験管に加え、Rabbit Anti-Goat IgG H&L (HRP) [Abcam, ab6741] 2 μ l と Blocking One 1.0 ml を添加し、懸濁後、4°C で保存した。使用時は、この液をそのままプラスチック容器に添加し、振とうした。使用後は、この液を回収し、4°C で保存した。[3 週間の保存期間で、複数回使用できる。]

抗 β -actin 抗体の調製: Anti- β -actin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体 (抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

ノックダウン細胞の調製は、第一章第一節-4)-A)、第二章第一節-2)-A) の方法に従って行った。ノックダウンの確認は、第一章第一節-4)-B) の方法に従って行った。

C) Panx1 ノックダウン THP-1 細胞における β 毒素の毒性評価

<実験材料>

第一章第一節-4)-A) と第二章第一節-2)-A) に示した。

<実験方法>

ノックダウン細胞の調製は、第一章第一節-4)-A) に従って行った。Panx1 をノックダウンし、2 日間培養した細胞を使用した。細胞生存率の測定は、第一章第一節-2) の方法に従って MTS 法で解析した。

D) Panx1 ノックダウン THP-1 細胞への β 毒素の結合

<実験材料>

第一章第一節-4)-A) と第二章第一節-2)-A) に示した。

<実験方法>

ノックダウン細胞の調製は、第一章第一節-4)-A) に従って行った。Panx1 をノック

ダウンし、2日間培養した細胞を使用した。 β 毒素の結合の解析は、第一章第一節-3)に従って、SDS-PAGE、Western blotting を行い、LAS-4000 で解析した。

3) β 毒素と Panx1 の直接相互作用の解析 [Dot-blot 法]

<実験材料>

ヒトリコンビナント Panx1: Panx1 (Human) Recombinant protein (P01) [Abnova, H00024145-P01] 10 μ g (60 μ l) を 15 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注し、-80°C で保存した。使用時は、50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で希釈し、調製した。

50% Glycerine-PBS (pH 7.4) (G-PBS) の調製: 第一章第二節-1)-A) と同様の方法で調製した。

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗 β 毒素ウサギ抗体) の調製: Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体 (抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

第一章第二節-1)-A) に従って行い、LAS-4000 で解析した。

<実験成績>

ウエルシュ菌β毒素の細胞毒性発現における Panx1 の役割について検討を行った。まず、Panx1 阻害剤である CBX、Pb、そして、Panx1 選択的阻害ペプチドである ¹⁰Panx1 や、その Negative control の sc-¹⁰Panx1 を細胞に作用させ、β毒素の細胞毒性に対する効果を MTS 法で解析した。その結果、Fig. 13A に示すように、Vehicle 存在下でβ毒素処理により約 40%の細胞生存率を示す条件で、阻害ペプチドの Negative control である sc-¹⁰Panx1 を除く 20 μM CBX、1 mM Pb、そして、200 μM ¹⁰Panx1 処理で本毒素の細胞毒性が有意に抑制された。すなわち、β毒素の作用に Panx1 が関与する可能性が示唆された。次に、本毒素の毒性を抑制した CBX と Pb を、同一条件で細胞に処理し、β毒素の細胞への結合に対する影響を、抗β毒素抗体を用いた Western blotting で検討した (Fig. 13B)。その結果、Vehicle 存在下と同様に、CBX と Pb 存在下でも本毒素の結合は同じレベルで、これらの阻害剤は、本毒素の細胞への結合を抑制しなかった。以上より、Panx1 阻害剤は本毒素の細胞への結合に影響を与えず毒性を阻害することから、Panx1 が本毒素の毒性発現のいずれかの段階で働いていると考えられる。次に、Panx1 の本毒素活性に対する役割をさらに明らかにするため、細胞に Panx1 の siRNA (si-Panx1) をトランスフェクトし、Panx1 のノックダウンを行い、β毒素の細胞毒性や細胞への結合に対する影響を検討した。その結果、Fig. 14A に示すように、Intact 細胞、Negative control (NC) siRNA トランスフェクト細胞と比較して、si-Panx1 トランスフェクト細胞で Panx1 のノックダウンが認められた。これらの細胞にβ毒素を作用させると、Intact 細胞、NC 細胞では、β毒素の濃度依存的に細胞毒性が認められるのに対し、Panx1 ノックダウン細胞では、本毒素の細胞毒性が抑制された (Fig. 14B)。次に、Panx1 ノックダウン細胞に対するβ毒素の結合を Western blotting で解析すると、Intact 細胞、NC 細胞で認められるβ毒素のモノマーとオリゴマーの結合と比較して、Panx1 ノックダウン細胞では、β毒素のモノマーの結合量は変化が認められないが、オリゴマー量が減少した (Fig. 14C)。すなわち、Panx1 をノックダウンしても、β毒素のモノマーは結合した。そこで、前述の Dot-blot 法で、β毒素と Panx1 の結合を直接的に解析した。Fig. 14D に示すよ

うに、Positive control の P2X₇R には、ドットした P2X₇R の量に依存してβ毒素が結合した。これに対し、ドットした Panx1 にはβ毒素の結合は認められなかった。以上より、本毒素は Panx1 に結合しないが、Panx1 は本毒素の細胞毒性シグナルに関与すると考えられる。

第二節 β毒素の細胞内 ATP 遊離作用

前節の結果より、β毒素の細胞毒性に Panx1 が関与することが明らかとなった。Panx1 は、活性化するとそのチャネルから細胞内 ATP を細胞外へ遊離することが知られている。本節では、β毒素が Panx1 を活性化して、ATP を遊離するかどうかを検討した。

【実験材料および実験方法】

1) β毒素による THP-1 細胞からの ATP 遊離 [ATP determination assay]

<実験材料>

組成液の調製

Luciferin-Luciferase cocktail solution の調製: 1 サンプル当たり、調製した A) 10 倍希釈 Luciferin solution 5 μl と C) Luciferase solution 0.24 μl を混合する。予め、実験前に使用する量に合わせてまとめて調製した。室温で、サンプル 50 μl に対し調製液を 5.2 μl 添加した。

A) Luciferin solution の調製 [Wako, 126-05111] M.W. 318.41: D-Luciferin Potassium Salt 10 mg を滅菌蒸留水 1.185 ml に溶解した (26.5 mM)。100 μl ずつ 1.5 ml チューブに分注し、-30°C で保存した。使用時は、滅菌蒸留水で 10 倍希釈 (2.65 mM) した。

B) LUMI solution: 下記の組成で Luciferase solution 用の希釈液を作製した。1 N NaOH で pH 7.8 に調整し、用時に、BSA (終濃度: 0.1%) を添加した。

Reagent	Final Conc.	M.W.	mg/100 ml
MgCl ₂	6.25 mM	203.3	127.06
EDTA · 2Na	0.63 mM	372.24	23.45
DTT	75 μM	154.25	1.16
HEPES	25 mM	238.31	595.78
BSA	1.0 mg/ml	-	100

C) Luciferase solution の調製 [Sigma-Aldrich, L9506]: Luciferase from Photinus pyralis (Firefly) 0.25 mg を LUMI solution 0.5 ml で溶解した (0.5 mg/ml)。30 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注し、 -30°C で保存した。

Ca²⁺ and Mg²⁺ containing Hank's balanced salt solution [HBSS (+)]: HBSS (-) [Nacalai tesque, 17461-05] 50 ml に CaCl₂ [Nacalai tesque, 06729-55] (M.W. 110.98) 6.67 mg (終濃度: 1.2 mM) と MgCl₂ [Nacalai tesque, 20909-55] (M.W. 203.3) 18.3 mg (終濃度: 1.8 mM) を溶解した。

<実験方法>

まず、Luciferin-luciferase cocktail solution を上述の方法で必要量を調製した。そして、本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、1.5 ml チューブに THP-1 細胞を 1×10^5 cells/100 μ l/tube (無血清 HBSS (+)) で分注した。その後、 37°C 、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションし、細胞を馴化した。CBX を用いた阻害実験では、培地に CBX (終濃度: 20 μ M) を添加し、 37°C 、5% CO₂ の条件下で 1 時間インキュベーションした。その後、 β 毒素 (終濃度: 0.5~2.5 μ g/ml) を添加し、 37°C 、5% CO₂ の条件下で 5~60 分間インキュベーションした。その後、室温で 2,700 rpm、2 分間遠心し、その上清 50 μ l を別の新しい 1.5 ml チューブに移し、3 分間煮沸を行い、ecto-ATPase を失活させた。これに、調製した Luciferin-luciferase cocktail solution を 5.2 μ l 添加して、混和し、直ぐに Luminometer [Promega, TD-20/20] で測定を行った。

2) β 毒素の THP-1 細胞への結合

<実験材料>

第一章第一節-3) に示した。

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗 β 毒素ウサギ抗体) の調製: Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体 (抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] 第一章第一節-3) と同様の方法で調製

した。

<実験方法>

第一章第一節-2)の方法に従って、実験を行い、第一章第一節-3)に従って、SDS-PAGE、Western blottingを行い、LAS-4000で解析した。

3) β 毒素によるリポソームからの ATP と CF の遊離

<実験材料>

DOPC 溶液の調製 [日油, 302-16881] M.W. 786.11: 1, 2-Dioleoyl-sn-glycero-3 phospho-choline (DOPC) 7.86 mg を Chloroform 200 μ l に溶解した (50 mM)。1.5 ml チューブに分注し、-30°C で保存した。

Chol 溶液の調製 [Nacalai tesque, 08721-62] M.W. 386.65: Cholesterol 3.87 mg を Chloroform 200 μ l に溶解した (50 mM)。1.5 ml チューブに分注し、-30°C で保存した。

ATP 溶液の調製 [Sigma-Aldrich, A8937] M.W. 583.4: ATP を 2.917 mg を HBSS (-) 100 μ l で溶解した (50 mM)。用時調製。

CF 溶液の調製 [Sigma-Aldrich, C4916] M.W. 460.39: 5-Carboxyfluorescein diacetate (CF) 4.6 mg を滅菌 PBS (-) で 200 μ l に溶解して使用した (50 mM)。1.5 ml チューブに 66 μ l ずつ分注し、-30°C で保存した。

0.25 % Gelatine-0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)-0.9 % NaCl (GTBS): Gelatine powder [Merck, 1.04078.0500] 0.25 g、0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 10 ml、NaCl 0.9 g を蒸留水に溶かし、全量を 100 ml として、加温により Gelatine を溶解した。

<実験方法>

ATP-CF 封入 DOPC-Chol リポソームの作成

DOPC 溶液と Chol 溶液を試験管に 50 μ l ずつ添加 (1:1 の比率となる) して混和した。その後、試験管を斜めに持ち、N₂ ガスをマイクロピペット用チップをホースに付けて噴射しながらゆっくり回転させ、Chloroform を完全に揮発させた。試験管の底に透明のリピッドフィルムが形成されるまで N₂ ガスを噴射した。その後、ドラフト内のデシケーターで減圧乾燥を 30 分間行い、完全に溶媒を除去した。そのリピッ

ドフィルムが形成された試験管に、ATP 溶液 30 μ l と CF 溶液 30 μ l を添加し、リピッドフィルム上で 30 秒間 vortex により水和し、55°C の水浴に試験管を入れ、30 秒間インキュベーションした。これらの操作は 3 回繰り返した。次に、氷中で 1 分間インキュベーションし、0.02 M TBS (pH 7.5) を 440 μ l を添加し、懸濁後、全量を 1.5 ml チューブに移した。再度、500 μ l の 0.02 M TBS (pH 7.5) で試験管から 1.5 ml チューブに洗いこみを行った。次に、リポソームの洗浄のため、4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清をアスピレーターで除去し、この操作を 3 回繰り返し、未封入の CF と ATP を除去した。最後のリポソームの沈殿に GTBS 500 μ l を添加して vortex で懸濁して、リポソーム溶液とした。ATP と CF の遊離実験は 100 μ l の系にこのリポソーム溶液 2 μ l を添加した。

CF 遊離の測定

96 well で底面が透明の黒プレート [Nunc, 165305] に、37°C に温めた 0.02 M TBS (pH 7.5) 100 μ l、または、Positive control の、2% Triton-TBS (pH 7.5) 100 μ l を添加した。これらにリポソーム溶液 2 μ l と β 毒素 (終濃度: 2.5 μ g/ml) を添加し、蛍光プレートリーダーである Tecan Infinite Pro200 にセットし、37°C 条件下で、経時的に CF の蛍光強度を測定した。Positive control は 2% Triton でリポソーム溶液を 2 時間インキュベーションした値を 100%として算出した。[測定条件: Ex: 492 nm, Em: 517 nm]

ATP 遊離の測定

1.5 ml チューブに 37°C の 0.02 M TBS (pH 7.5) 100 μ l、または、Positive control の 2% Triton-TBS (pH 7.5) 100 μ l を添加した。これらにリポソーム溶液 2 μ l と β 毒素 (終濃度: 2.5 μ g/ml) を添加し、37°C でインキュベーションした。時間ごとにチューブを取り出し、室温で 15,000 rpm、5 分間遠心しリポソームを除去した。上清 50 μ l を第二章第二節-1) の方法に従って、発光強度を測定した。Positive control は 2% Triton でリポソーム溶液を 2 時間インキュベーションした値を 100%として算出した。

4) ATP-CF 封入 DOPC-Chol リポソームに対する β 毒素の結合

<実験材料>

第二章第二節-2) と第二章第二節-3) に示した。

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗β毒素ウサギ抗体) の調製: Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体 (抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

リポソームの調製は、第二章第二節-3) に従って行った。0.02 M TBS (pH 7.5) 100 μl を 1.5 ml チューブに添加し、これらにリポソーム溶液 10 μl を添加し、実験に使用した。リポソームを含んだチューブは予め 4°C 条件下で 60 分間インキュベーションし、同条件でβ毒素 (終濃度: 2.5 μg/ml) を添加し、4°C で30分間インキュベーションした。その後、4°C で 15,000 rpm、10 分間遠心した。上清を除去し、氷冷した GTBS 500 μl を添加し、4°C で 15,000 rpm、10 分間遠心し、この操作を 2 回行った。沈殿したリポソームに、37°C に温めた TBS を添加して懸濁後、37°C で 5~60 分間インキュベーションした。その後、室温で 15,000 rpm、5 分間遠心し、上清を除去した。沈殿に SDS-sample buffer を 50 μl 添加し混和後、37°C で 2 時間インキュベーションして溶解させた。その後、第一章第一節-3) に従って、SDS-PAGE、Western blotting を行い、LAS-4000 で解析した。

<実験成績>

前節でウエルシュ菌β毒素がPannx1を介して細胞毒性を示すことが明らかとなった。Pannx1は活性化により、細胞内ATPを細胞外へ遊離することが知られている(85, 86)。そこで、THP-1細胞と種々の濃度のβ毒素を37°Cでインキュベーションし、THP-1細胞から遊離するATPを、LuciferinとLuciferaseを用いたATP determination assayにより測定した(Fig. 15)。その結果、Fig. 15Aに示すように、β毒素処理後5~15分に一過性のATP遊離が用量依存的に認められた。さらに、細胞毒性が強く現れる60分後において、初期に認められたATP遊離の約10倍量のATP遊離が認められた。さらに、本毒素によるATP遊離は、CBX処理で抑制された。以上より、本毒素はPannx1チャンネルからのATP遊離を引き起こすと推察された。次に、β毒素のTHP-1細胞への結合をWestern blottingで検討すると、処理時間に依存して、β毒素のモノマーとオリゴマーが共に増加し、初期のATP遊離が起こる5~15分ではβ毒素オリゴマーの量は少ないことが判明した(Fig. 15B)。以上より、初期のATP遊離はβ毒素のオリゴマー(ポア)からではなく、Pannx1を介して遊離することが示唆された。そこで、β毒素によるATP遊離機構をさらに解析するため、β毒素が破壊することが報告されている人工脂質二重膜のDOPC-CholリポソームにATPと蛍光物質であるCFを封入し、β毒素を作用させ、リポソームからのATPとCF遊離を観察した。その結果、Fig. 15Cに示すように、リポソームにおいてTHP-1細胞で観察された本毒素による初期のATP遊離は認められず、β毒素の処理時間に依存して、60分以降でATPとCFが同様の時間経過で遊離した。そこで、リポソームに対するβ毒素の結合を観察した。リポソームとβ毒素を4°Cで1時間インキュベーションし、洗浄後、37°Cで種々の時間インキュベーションした。リポソームに対するβ毒素の結合は、抗β毒素抗体を用いたWestern blottingで解析した。その結果、データには示さないが、β毒素は4°Cでは、モノマーで結合した。このリポソームを、洗浄後、37°Cでインキュベーションすると、5分と15分ではモノマー量が多く、このモノマーは時間と共に減少し、30分以降ではモノマーが減少し、オリゴマーが時間と共に増加した(Fig. 15D)。以上の結果より、β毒素はリポソーム破壊によりATPとCFを遊離させると考

えられる。

第三節 β毒素の細胞毒性における細胞外 ATP の役割

前節までの結果より、β毒素は、P2X₇R に結合後、P2X₇R に共役している Panx1 を活性化して、初期に一過性の ATP 遊離作用を示すことが明らかとなった。本節では、本毒素の作用により遊離した ATP が、β毒素の細胞毒性にどのような影響を与えているかを検討した。

【実験材料および実験方法】

<実験材料>

1) β毒素の細胞毒性における Apyrase や Hexokinase の効果

<実験材料>

Apyrase の調製 [Sigma-Aldrich, A6535]: Apyrase 100 U に滅菌蒸留水 100 μl を添加して溶解し、1.5 ml チューブに全量を移し、4°C で保管した (1 KU/ml)。

Hexokinase の調製 [Sigma-Aldrich, H4502]: Hexokinase 500 U に滅菌蒸留水 50 μl を添加して溶解し、1.5 ml チューブに全量を移し、4°C で保管した (2 KU/ml)。

Cell Counting Kit-8 (MTS 試薬): 第一章第一節-2) に示した。

A) β毒素処理 10 分前に ATPase 処理した場合

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、96 well プレートに THP-1 細胞を 1×10^5 cells/100 μl/well (無血清 RPMI 1640 培地) を播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションし、馴化した。ATPase の 10 分間添加の効果を検討するため、Apyrase は 2.5、5、10 U/ml、または、Hexokinase は 5、10、20 U/ml を添加した。一方、ATPase の未処理細胞には、同量の滅菌蒸留水を添加した。種々の ATPase を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 10 分間インキュベーション後、β毒素 (終濃度: 1 μg/ml) を添加して、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間インキュベーションした。Negative control は Apyrase (終濃度: 10 U/ml)、または、Hexokinase (終濃度: 20 U/ml) を添加し、10 分後に Buffer (β毒素希釈液) を添加した。細胞生

存率の測定は、第一章第一節-2) の方法に従って MTS 法で解析した。

B) β 毒素処理 10 分後に ATPase 処理した場合

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、96 well プレートに THP-1 細胞を 1×10^5 cells/100 μ l/well (無血清 RPMI 1640 培地) を播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションし、馴化した。ATPase の 10 分後添加の効果を検討する実験では、Apyrase は 2.5、5、10 U/ml、または、Hexokinase は 5、10、20 U/ml を添加した。一方、ATPase の未処理細胞には、同量の滅菌蒸留水を添加した。 β 毒素 (終濃度: 1 μ g/ml) を添加して、37°C、5% CO₂ の条件下で 10 分間インキュベーション後、種々の ATPase を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間インキュベーションした。Negative control は 10 分前に Buffer (β 毒素希釈液) を添加し、Apyrase (終濃度: 10 U/ml) と Hexokinase (終濃度: 20 U/ml) を添加した。細胞生存率の測定は、第一章第一節-2) の方法に従って MTS 法で解析した。

2) β 毒素の細胞への結合に対する ATP の効果

<実験材料>

ATP 溶液の調製 [Sigma-Aldrich, A8937] M.W. 583.4: ATP 2.917 mg を滅菌 PBS (-) 100 μ l で溶解し、使用した (50 mM)。この液を段階希釈して、10 nM を作製し、使用した。用時調製。

使用した抗体

抗不活化毒素血清 (抗 β 毒素ウサギ抗体) の調製: Anti-beta-toxin rabbit polyclonal IgG を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体 (抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

第一章第一節-2) の方法に従って、無血清 RPMI 1640 培地で THP-1 細胞を調製した。次に、 β 毒素 (終濃度: 250 ng/ml) と ATP (終濃度: 10 pM、または、100 pM)

を同時に添加し、37°C、5% CO₂の条件下で10分間、または、30分間インキュベーションした。その後、第一章第一節-3)に従って、SDS-PAGE、Western blottingを行い、LAS-4000で解析した。

3) β毒素の細胞毒性に対するATPの効果

<実験材料>

ATP 溶液の調製 [Sigma-Aldrich, A8937] M.W. 583.4: 第二章第三節-2)に示した。

他は第一章第一節-3)に示した。

<実験方法>

第一章第一節-2)の方法に従って、無血清RPMI 1640培地でTHP-1細胞を調製した。次に、β毒素(終濃度: 250 ng/ml)とATP(終濃度: 10 pM、または、100 pM)を同時に添加し、37°C、5% CO₂の条件下で1時間インキュベーションした。細胞生存率の測定は、第一章第一節-2)の方法に従ってMTS法で解析した。

<実験成績>

β毒素の THP-1 細胞に対する細胞毒性において、本毒素の作用により Panx1 から遊離した ATP がどのような影響を及ぼしているかを検討した。まず、β毒素の細胞毒性に対する ATPase の効果を調べた。Fig. 16 に示すように、本毒素処理 10 分前、あるいは 10 分後に ATPase である Apyrase や Hexokinase を添加し、細胞毒性を観察した。Apyrase と Hexokinase は ATP を分解し、細胞毒性に影響を与えない濃度を使用した。Fig. 16A に示すように、β毒素単独処理では、約 50%の細胞生存率を示した。これに対して、種々の濃度の ATPase を本毒素処理 10 分前に処理した場合、Apyrase 処理では、5 U/ml 以上で、また、Hexokinase は 10 U/ml 以上で、細胞生存率は有意に上昇した。一方、本毒素処理 10 分後に種々の ATPase を添加した場合 (Fig. 16B)、β毒素単独処理では、約 50%の細胞生存率を示す条件で、Apyrase、または、Hexokinase を添加しても、いずれの濃度でも、細胞生存率の上昇は認められなかった。以上の結果より、ATPase の前処理により本毒素の細胞毒性が抑制されることが判明した。次に、無血清培地の THP-1 細胞に、β毒素と同時に外因的に ATP を添加し、10 分後と 30 分後における本毒素の結合を Western blotting で解析した。その結果、ATP を添加していない系と比較して、10 pM、または、100 pM ATP を添加した系において ATP の添加量依存的にβ毒素モノマーとオリゴマーのバンド量が増加した (Fig. 17A)。そして、本毒素と ATP を同時添加し、1 時間インキュベーションしたときの細胞毒性を検討すると、ATP を添加していないβ毒素単独処理では約 90%の細胞生存率を示す条件で、10 pM、または、100 pM ATP とβ毒素を同時に添加した場合、いずれも、約 60%の細胞生存率となり、ATP 添加により、細胞毒性が増強した (Fig. 17B)。以上の結果より、β毒素による Panx1 活性化により遊離した ATP が、本毒素の細胞への結合と細胞毒性の増強に関与していると考えられる。

第四節 考察および小括

<考察>

β 毒素は $P2X_7R$ を介して、細胞に結合し、細胞膜上の脂質ラフトでオリゴマーを形成し、細胞毒性を示すことが明らかとなった。本章では、 $P2X_7R$ と共役して存在し、ATP 遊離チャネルである $Panx1$ に着目し、本毒素の細胞毒性と $Panx1$ の関係について検討した。

β 毒素と同じ β -PFT ファミリーの毒素である *E. coli* が産生する α -hemolysin や *A. actinomycetemcomitans* が産生する Leukotoxin は、 $Panx1$ を介して細胞毒性を示すことが報告されている (64, 69)。そこで、本毒素の作用における $Panx1$ の効果を調べるため、 $Panx1$ 阻害剤 (CBX と Pb) や $Panx1$ 阻害ペプチドで処理した細胞に対する本毒素の細胞毒性を検討した。その結果、Vehicle 処理と比較して、 $Panx1$ 阻害剤の処理により本毒素の細胞毒性は抑制された。次に、この条件で本毒素の結合を検討すると、 $Panx1$ 阻害剤は本毒素の細胞への結合に影響を与えなかった。以上より、 $Panx1$ 阻害剤は β 毒素の結合に影響を与えないことから、本毒素の細胞毒性シグナルを抑制していると考えられる。次に、 β 毒素の作用における $Panx1$ の効果をさらに検討するため、 $Panx1$ の siRNA を細胞にトランスフェクトした $Panx1$ ノックダウン細胞に対する本毒素の細胞毒性を検討すると、 β 毒素の細胞毒性が有意に抑制された。また、 $Panx1$ ノックダウン細胞における本毒素の結合を検討すると、 β 毒素のモノマーの結合は変化しないが、オリゴマーの形成が減少した。すなわち、 $Panx1$ の発現低下が β 毒素のオリゴマー形成に何らかの影響を与えていると考えられ、これは、後述する ATP 添加で β 毒素の結合が促進する結果とよく一致する。次に、 β 毒素と $Panx1$ 間の直接的な相互作用を検討するため、Dot-blot 法を用いて、両者の結合を解析したが、 β 毒素と $Panx1$ は、直接結合しないことが明らかとなった。以上の結果より、本毒素は $Panx1$ に結合せず、本毒素が $P2X_7R$ に結合後、何らかの刺激を介して $Panx1$ を活性化し、細胞毒性を示していると考えられる。

$Panx1$ は $P2X_7R$ と共役しており、ATP が $P2X_7R$ を活性化すると、 $Panx1$ が活性

化され、そのチャネルから細胞内 ATP を細胞外へ遊離することが報告されている (81, 85)。そこで、 β 毒素処理した THP-1 細胞の培養上清中に遊離した ATP 量を測定すると、本毒素処理 5~15 分で一過性の ATP 遊離が認められた。さらに、本毒素により細胞破壊が進行し、細胞毒性が強くなる 60 分後では、大量の ATP 遊離が認められた。これらの ATP 遊離は Panx1 阻害剤である CBX 処理により抑制されたことから、 β 毒素は Panx1 を介して ATP を遊離させ、遊離した ATP はその後の細胞毒性に何らかの影響を与えたと推察される。本毒素による ATP 遊離が一過性である原因として、ATPase による急速な ATP の分解 (90)、Panx1 エンドサイトーシスによる細胞外 ATP 遊離の低下 (85, 91)、そして、遊離した ATP による Negative feedback (92) 等の様々なメカニズムが挙げられる。一方、*E. coli* が産生する α -hemolysin の場合、細胞膜上で形成されたオリゴマーによるポアから、ATP が遊離することが報告された (87)。そこで、 β 毒素処理による ATP 遊離機構をさらに解析するため、DOPC と Chol で構成されたリポソームに ATP と CF を封入し、 β 毒素による ATP と CF の遊離を検討した。本検討では、CF の遊離は本毒素によるリポソームの膜破壊の指標として使用した。リポソームに β 毒素を作用させると、本毒素を細胞に作用させたときに認められた初期の ATP 遊離は認められず、処理時間に依存して、徐々に ATP と CF がほぼ同じタイムコースで遊離した。すなわち、ATP と CF は、本毒素のリポソーム膜破壊作用により遊離すると考えられる。そこで、本毒素による ATP と CF 遊離が β 毒素オリゴマーによる膜破壊によるものかどうかをさらに検討するため、リポソームに対する、 β 毒素の結合を検討した。4°C でリポソームと β 毒素を結合させ、37°C で種々の時間インキュベーションした。4°C で本毒素はモノマーで結合し、これを 37°C でインキュベーションすると、結合したモノマーは時間とともにオリゴマーを形成した。以上の結果より、 β 毒素処理リポソームにおける ATP 遊離は、 β 毒素のオリゴマー形成によるポアがリポソーム膜破壊に関係していることが明らかとなった。以上の結果より、 β 毒素は、THP-1 細胞に対して、初期における Panx1 からの ATP 遊離と、後期の本毒素のオリゴマー形成による細胞破壊により ATP を遊離させることが明らかとなった。Panx1 の一過性の活性化は、抗 CD3-CD28 抗体の刺激による T 細胞の活性化でも報告されている (92)。すなわち、P2X₇R-Panx1 系は宿主の免疫調節の役割

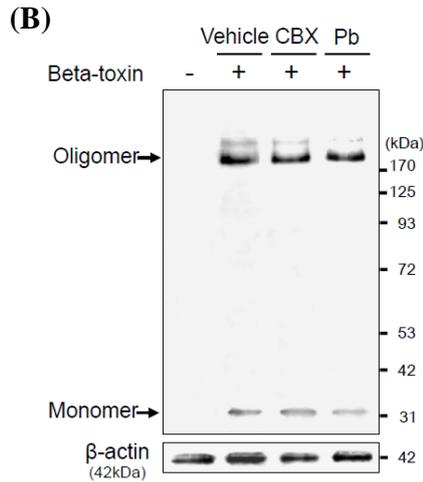
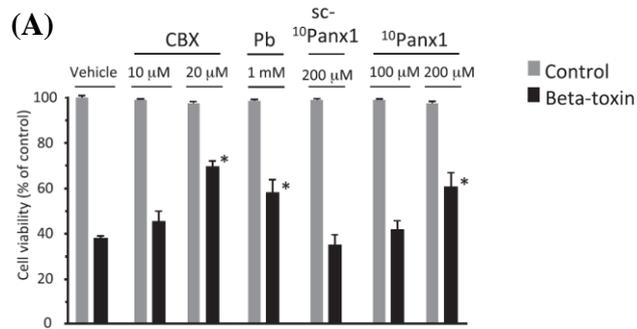
を担っており、 β 毒素は、その機能を巧みに利用して、細胞毒性を示すと考えられる。

遊離した初期の ATP が β 毒素の細胞毒性にどのような影響を与えているかを明らかにするため、ATPase である Apyrase や Hexokinase の本毒素の細胞毒性に対する効果を検討した。本毒素添加 10 分前に ATPase を処理した場合、本毒素の細胞毒性が抑制された。一方、毒素添加 10 分後に ATPase を添加しても細胞毒性の抑制は認められなかった。以上の結果より、本毒素処理により遊離した初期の ATP は、本毒素の細胞毒性に関与すると考えられる。そこで、遊離した ATP が本毒素の細胞毒性をどのようなメカニズムで増強しているかを検討するため、無血清培地中の THP-1 細胞に β 毒素と ATP を同時に添加し、本毒素の細胞毒性や結合を解析した。その結果、ATP の添加量に依存して、本毒素の細胞への結合と細胞毒性が増加した。すなわち、細胞外に遊離した ATP が、 β 毒素の結合とオリゴマー形成を促進していることが明らかとなった。そのメカニズムとして以下の可能性が考えられる。リガンドである ATP による P2X₇R の活性化は、細胞膜の脂質代謝に影響を与える PLA₂、PLC、そして、PLD を刺激して、膜の流動性を変化させること、そして、*de novo* に細胞膜でのセラミド生成を増加させることが報告されている (93)。P2X₇R は、これら膜脂質の変化により生成したセラミドの、細胞膜脂質ラフトやセラミドリッチマイクロドメインへの輸送に応じて、脂質ラフトへ集積する (93)。この細胞膜のリン脂質組成の変化が、本毒素の容易な結合と、オリゴマーを形成しやすい状況を作っている可能性が考えられる。細胞外に遊離した ATP がどのように本毒素のオリゴマー化を促進するかを詳細に明らかにするためには、さらなる検討が必要である。今後、Panx1 は、 β 毒素による壊疽性腸炎の治療戦略の新しい標的分子となる可能性がある。

<小括>

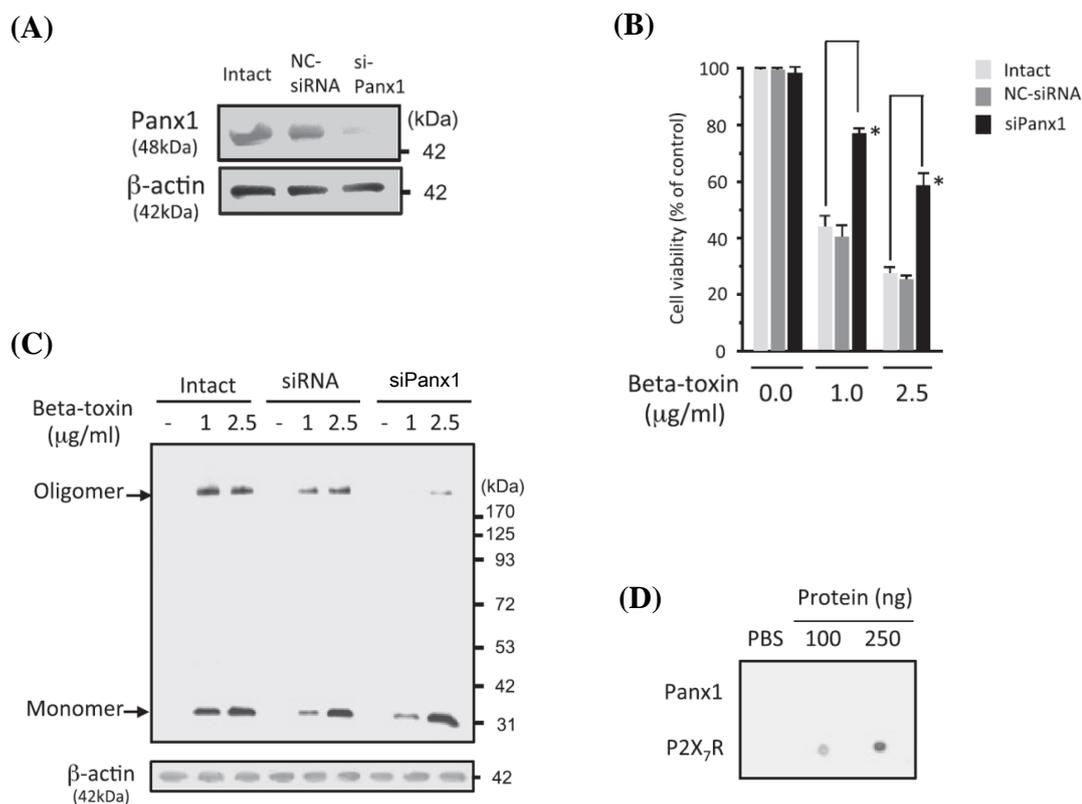
β 毒素は、P2X₇R に結合後、何らかの刺激を介して一過性に Panx1 を活性化し、細胞外へ ATP を遊離する。遊離した ATP は本毒素の細胞への結合やオリゴマー形成を促進し、本毒素の細胞毒性に強く関与していることが明らかとなった。

Fig. 13 Effect of Panx1 inhibitors on cytotoxicity and binding of beta-toxin in THP-1 cells.



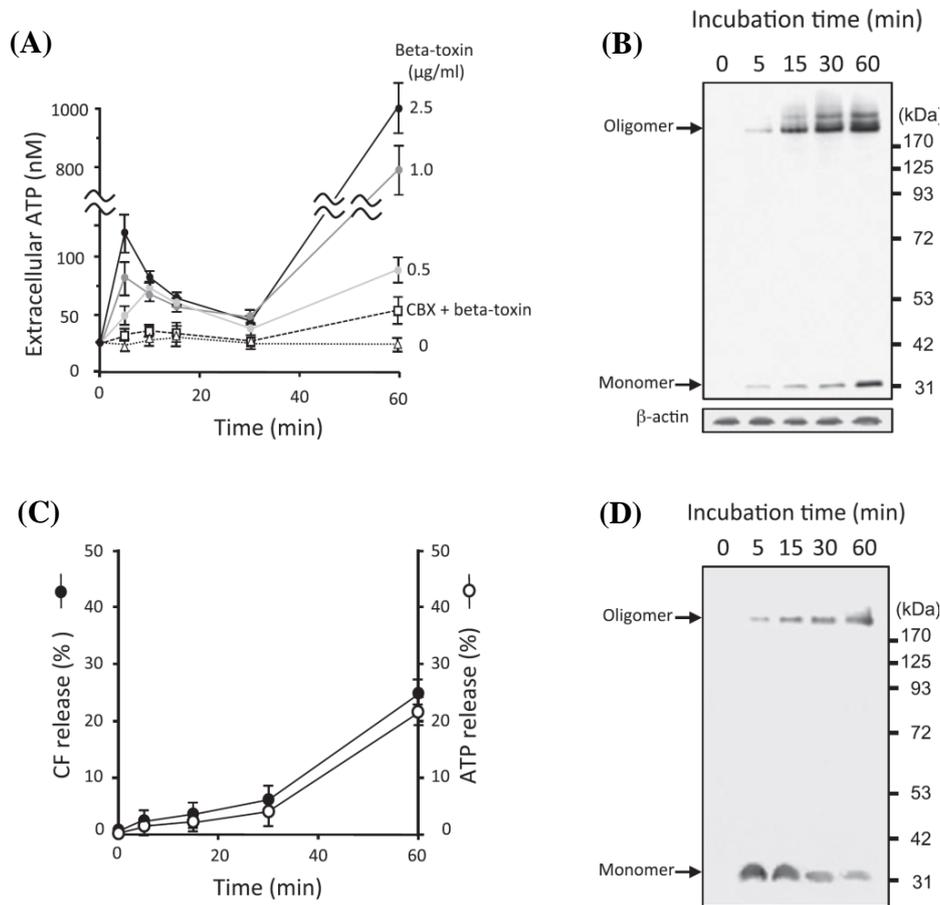
(A) THP-1 cells pretreated with various inhibitors for 1 h at 37°C were treated with beta-toxin (1 μg/ml) for 1 h at 37°C. Cell viability was monitored using an MTS cell assay. Abbreviations: CBX, carbenoxolone; Pb, probenecid; sc-10Panx1, scrambled-10Panx1; 10Panx1, pannexin1 (Panx1) mimetic inhibitory peptide. Data are indicated as percentages of the values obtained with controls (mean ± SD for four independent experiments). One-way analysis of variance was employed to assess statistical significance. * $P < 0.05$, significantly different from vehicle plus beta-toxin. (B) THP-1 cells pretreated with DMSO; vehicle, 20 μM CBX or 1 mM Pb for 60 min at 37°C were treated with beta-toxin (1 μg/ml) for 30 min at 37°C. After washing, cells were lysed, and beta-toxin and β-actin (control) were detected by Western blotting using specific antibodies. A representative result from one of three experiments is indicated.

Fig. 14 Effect of siRNAs for the Panx1 on cytotoxicity and binding of beta-toxin in THP-1 cells.



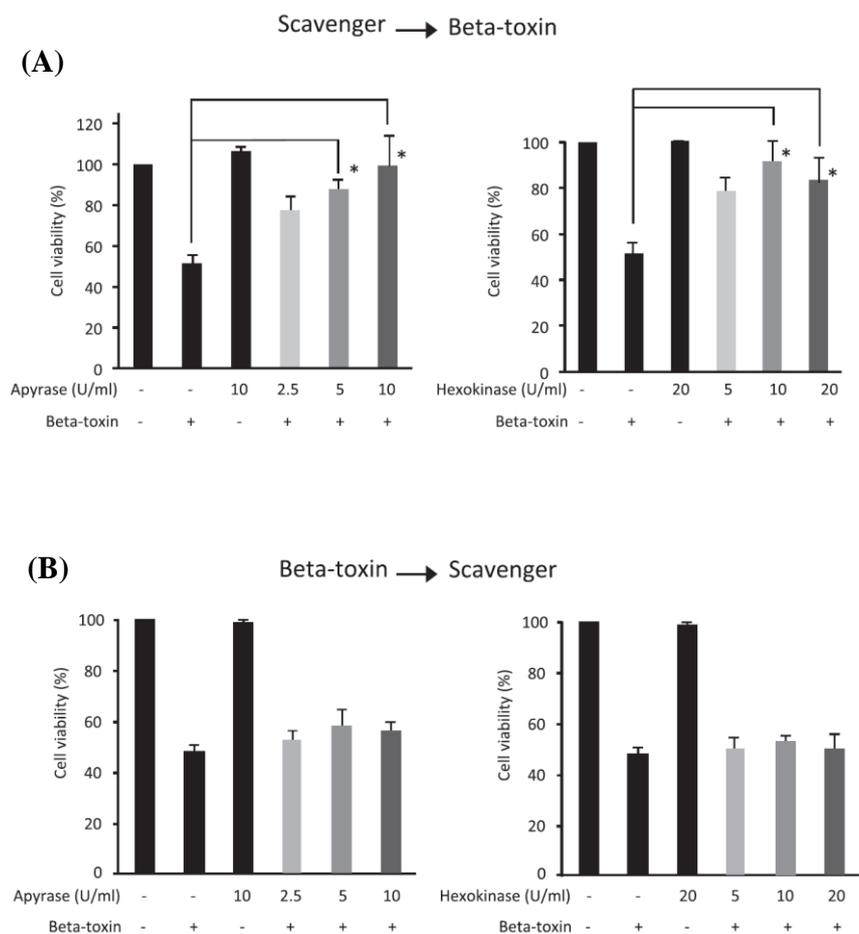
(A) The expression of Panx1 in cells transfected with siRNA was determined by Western blotting utilizing antibodies against Panx1 and β -actin. A representative result from one of three experiments is shown. (B) Intact cells, negative control (NC)-siRNA-treated cells, or siPanx1-treated cells were treated with beta-toxin (1 μ g/ml) for 1 h at 37°C. Cell viability was monitored by MTS assays. Data are indicated as percentages of the values obtained with controls (mean \pm SD for four independent experiments). Two-tailed Student's t-test was employed to assess statistical significance. * $P < 0.05$, significantly different from NC-siRNA-transfected cells plus beta-toxin. (C) Intact cells, NC-siRNA-treated cells, or siPanx1-treated cells were treated with beta-toxin for 1 h at 37°C. After washing, cells were lysed, and beta-toxin and β -actin (control) were determined by Western blotting using specific antibodies. A representative result from one of three experiments is indicated. (D) Dot-blot assay of the interaction between beta-toxin and Panx1. Purified Panx1 and P2X₇R proteins were blotted onto a PVDF membrane. The membrane was blocked, and incubated with beta-toxin (100 ng/ml). After washing, the membrane was incubated with anti-beta-toxin antibody and secondary peroxidase-coupled antibody to detect bound beta-toxin using an enhanced chemiluminescence reaction. A typical results from one of three experiments are indicated.

Fig. 15 Beta-toxin-induced ATP release from THP-1 cells.



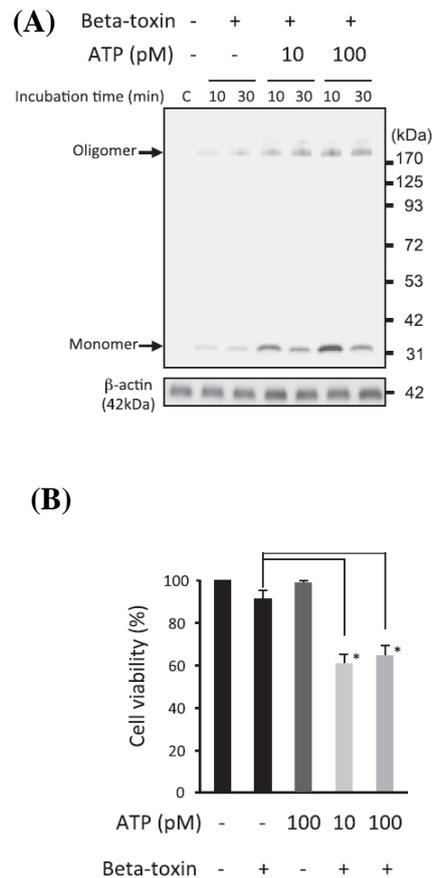
(A) THP-1 cells were treated with various concentrations of beta-toxin for the indicated times at 37°C. For inhibition experiments, THP-1 cells pretreated with 20 µM carbenoxolone (CBX) for 1 h at 37°C were incubated with beta-toxin (1 µg/ml) for the indicated times at 37°C. Extracellular ATP was monitored using an ATP-determination assay. Data are representative of four independent experiments and are expressed as mean ± SD. (B) THP-1 cells were treated with beta-toxin (1 µg/ml) for the indicated times at 37°C. The cells were lysed in SDS-loading buffer without heating and subjected to Western blotting of beta-toxin and β-actin (control). A typical result from one of three experiments is indicated. (C) ATP- and 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CF)-loaded liposomes (dioleoyl-L-α-phosphatidylcholine [DOPC] and cholesterol = 1:1) were exposed to beta-toxin (2.5 µg/ml) for the indicated times at 37°C. Released ATP was monitored using an ATP-determination assay. CF release was measured with microplate fluorometer. Maximal release at the end of each experiment was assessed by lysis with 2% Triton X-100 (final concentration). Data are representative of four independent experiments and are expressed as mean ± SD. (D) Liposomes (DOPC and cholesterol = 1:1) were incubated with beta-toxin (2.5 µg/ml) for the indicated times at 37°C. Liposomes were lysed in SDS-loading buffer without heating and subjected to Western blotting of beta-toxin. A representative result from one of three experiments is indicated.

Fig. 16 Effect of apyrase or hexokinase on beta-toxin-caused cell death.



(A) THP-1 cells treated with various concentrations of apyrase or hexokinase at 37°C for 10 min were incubated with beta-toxin (1 µg/ml) for 1 h at 37°C. Cell viability was monitored using a MTS assay. (B) THP-1 cells pretreated with beta-toxin (1 µg/ml) for 10 min at 37°C were incubated with various concentrations of apyrase or hexokinase for 1 h at 37°C. Cell viability was monitored using an MTS cell assay. Data are indicated as percentages of the values obtained with untreated controls (mean ± SD for four independent experiments). One-way analysis of variance was employed to assess statistical significance. **P* < 0.01, significantly different from phosphate-buffered saline plus beta-toxin.

Fig. 17 Effect of ATP on beta-toxin-caused cytotoxicity in THP-1 cells.



(A) THP-1 cells were treated with beta-toxin (250 ng/ml) in the presence or absence of ATP for the indicated times at 37°C. The cells were lysed in SDS-loading buffer without heating and subjected to Western blotting of beta-toxin and β -actin (control). A representative result from one of three experiments is indicated. (B) THP-1 cells were incubated with beta-toxin (250 ng/ml) in the presence or absence of ATP for 1 h at 37°C. Cell viability was monitored using an MTS cell assay. Data are indicated as percentages of the values obtained with untreated controls (mean \pm SD for four independent experiments). One-way analysis of variance was employed to assess statistical significance. * $P < 0.05$, significantly different from PBS plus beta-toxin.

第三章 ウエルシュ菌β毒素の細胞毒性における p38 MAPK の役割

ウエルシュ菌β毒素は、β-PFT ファミリーに属するオリゴマー形成毒素である。β-PFT は産生菌からモノマーで菌体外へ分泌され、感受性細胞膜上でオリゴマーを形成し、機能的なポアとなり、細胞膜を破壊して細胞毒性を示す (37, 94)。β毒素と同じβ-PFT ファミリーの毒素として、*S. aureus* α-toxin、Leucocidin、そして、γ-toxin 等が知られている (21, 94)。β毒素は、感受性細胞上で 228 kDa の 7 量体のオリゴマーを形成し、カチオン選択性の機能的なポアとなり、細胞死を誘導する (42, 56)。これに対して、同じファミリーの *S. aureus* α-toxin は同様に 7 量体のポアを形成する。これは、アニオン優位なチャネルであるが、カチオンも透過させる (95, 96)。β毒素と α-toxin は同じβ-PFT ファミリーに属しているが、ポア (チャネル) のイオン選択性は異なる。

これまでの研究で、β-PFT が感受性細胞に作用すると、宿主細胞はその障害作用に抵抗するため、MAPK ファミリーが活性化され、これは、宿主の防御シグナルとして機能することが報告されている (97-102)。MAPK シグナルは、細胞に対する種々のストレスや障害作用が引き金となり活性化される。一方、β-PFT の場合、β-PFT のポアからの細胞内 K⁺遊離による細胞内 K⁺濃度の低下が p38 MAPK 活性化のトリガーになると考えられている (101)。これらストレスに抵抗する p38 MAPK の活性化は、組織障害による炎症反応の拡大抑制や脂質合成の促進による細胞膜の修復など細胞を障害からレスキューする方向に誘導する (101)。さらに、Ratner は、低濃度のβ-PFT が上皮細胞に作用すると、感染初期における前炎症反応を誘導し、宿主細胞に抵抗性を与え、感染に対して防御的に働くと報告している (99)。

本研究では、β毒素処理により、宿主の防御シグナルである p38 MAPK や JNK の活性化が促進するかどうかを検討した。

第一節 β 毒素の細胞内 K^+ 遊離作用

β -PFT は、感受性細胞にモノマーで結合後、オリゴマーを形成し、それが機能的なポアとなり、細胞内 K^+ を細胞外へ遊離させる作用を有する。これらの結果、宿主細胞の生存シグナルが惹起されることが知られている (100, 101)。本節では、 β 毒素が、他の β -PFT と同様に感受性細胞において K^+ 遊離を起こすかどうかを検討した。

【実験材料および実験方法】

1) β 毒素による THP-1 細胞からの細胞内 K^+ の遊離作用

<実験材料>

HBSS (-): 第二章第二節で示した。

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、6 well プレートに THP-1 細胞を 1×10^6 cells/2.0 ml/well (HBSS (-)) で播種し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 10 分間インキュベーションし馴化した。その後、種々の濃度の β 毒素を添加し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 15~120 分間インキュベーションした。上清 50 μl を専用カップに取り、さらに超純水 50 μl を添加して希釈した。グラフアイト法により原子吸光光度計 [Hitachi, Z8200] で、細胞外へ遊離した K^+ を測定した。 K^+ の標準液は 1000 ppm [Nacalai tesque, L3318] を超純水で 0、25、50、100、200、400 ppm に希釈し、検量線を作成した。この検量線から、遊離した K^+ 濃度 (ppb) を算出した。

β 毒素の熱不活化

β 毒素の熱不活化は、本毒素溶液を 1.5 ml チューブに入れ、必要分量を 1.5 ml チューブに分注し、 95°C で 10 分間加熱し、熱不活化 β 毒素として使用した。

<実験成績>

ウエルシュ菌 β 毒素を THP-1 細胞に作用させ、細胞内から上清中に遊離した K^+ を、原子吸光光度計で測定した (Fig. 18)。その結果、 β 毒素は、 $0.5\sim 5\ \mu\text{g/ml}$ の範囲で用量と時間依存的な K^+ 遊離作用を示した。本毒素 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ では、60 分後に K^+ 遊離量はプラトーに達したのに対し、本毒素 $5\ \mu\text{g/ml}$ では処理後 30 分で K^+ 遊離量がプラトーに達し、 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ の最大遊離量と比較して約 3 倍の K^+ 遊離量を示した。一方、熱不活化 β 毒素では、 K^+ 遊離作用を全く示さなかった。以上の結果より、 β 毒素は、THP-1 細胞に作用して、細胞内 K^+ 遊離作用を示すことが明らかとなった。

第二節 β 毒素の細胞毒性と MAPK シグナルの関係

前節の結果より、 β 毒素は感受性細胞に対して細胞内 K^+ 遊離作用を示すことが明らかとなった。一般に、 β -PFT による細胞内 K^+ 遊離がトリガーとなり、宿主細胞の細胞生存シグナルとして知られている p38 MAPK や JNK が活性化されることが報告されている (101, 102)。本節では、 β 毒素による K^+ 遊離作用と宿主の MAPK ファミリーの活性化の関係について検討を行った。

【実験材料および実験方法】

1) β 毒素による THP-1 細胞の p38 MAPK と JNK のリン酸化

<実験材料>

使用した抗体

抗 p38 MAPK 抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 5.0 ml を中試験管に入れ、Anti-p38 MAPK Rabbit IgG Antibody [Cell signaling, 9212] 5 μ l と Blocking One-P 250 μ l を添加し使用した。(1000 倍希釈)

抗 P-p38 MAPK 抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 5.0 ml を中試験管に入れ、Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Rabbit IgG Antibody [Cell signaling, 9211] 5 μ l と Blocking One-P 250 μ l を添加し使用した。(1000 倍希釈)

抗 JNK 抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 5.0 ml を中試験管に入れ、Anti-SAPK/JNK Rabbit IgG Antibody [Cell signaling, 9252] 5 μ l と Blocking One-P 250 μ l を添加し使用した。(1000 倍希釈)

抗 P-JNK 抗体の調製: 0.1% Tween 20-TBS 5.0 ml を中試験管に入れ、Anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Rabbit IgG Antibody [Cell signaling, 9251] 5 μ l と Blocking One-P 250 μ l を添加し使用した。(1000 倍希釈)

抗 β -actin 抗体の調製: Anti- β -actin rabbit polyclonal IgG [BioLegend, 622102] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

HRP 結合型抗ウサギ抗体 (抗ウサギ二次抗体) の調製: Anti-rabbit IgG,

HRP-linked antibody [Cell Signaling, 7074] を第一章第一節-3) と同様の方法で調製した。

Blocking One-P [Nacalai tesque, 05999-84]: リン酸化抗体用の Blocking 剤で、PVDF 膜のブロッキング時 (室温で 30 分間) には原液を使用した。また、一次抗体や二次抗体の希釈液として、Blocking One-P を 0.1% Tween 20-TBS で 20 倍希釈して、使用した。

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、48 well プレートに THP-1 細胞を 2×10^5 cells/300 μ l/well (FBS/RPMI 1640 培地) で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間馴化した。その後、 β 毒素 (終濃度: 0.5 μ g/ml) を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で種々の時間インキュベーションした。第一章第一節-3) に従って、SDS-PAGE、Western blotting を行い、LAS-4000 で解析した。

2) β 毒素の細胞毒性における MAPK 阻害剤の効果

<実験材料>

SB203580 の調製 [Wako, 196-15601] M.W. 377.43: SB203580 1.0 mg を DMSO 133 μ l で溶解し、20 mM とした。細胞処理時に DMSO で 10 倍希釈 (2 mM) し、希釈液を培地 300 μ l に対して 1.5 μ l 添加した (終濃度: 10 μ M)。

SP600125 の調製 [Wako, 197-16591] M.W. 220.23: SP600125 1.0 mg を DMSO 228 μ l で溶解し、20 mM とした。細胞処理時に DMSO で 10 倍希釈 (2 mM) し、希釈液を培地 300 μ l に対して 1.5 μ l 添加した (終濃度: 10 μ M)。

NAC の調製 [Wako, 013-05133] M.W. 163.19: N-Acetyl-L-cysteine 8.0 mg を DMSO 98 μ l で溶解し、500 mM とした。培地 300 μ l に対して 1.5 μ l 添加した (終濃度: 2.5 mM)。

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、96 well プレートに THP-1 細胞を 1×10^5 cells/100 μ l/well (FBS/RPMI 1640 培地) で播種し、Negative control には Vehicle として DMSO、SB203580 (終濃度: 10 μ M)、SP600125 (終濃度: 10 μ M)、

または、NAC (終濃度: 2.5 mM) を細胞に添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間インキュベーションした。その後、β毒素 (終濃度: 5 µg/ml) を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 時間インキュベーションした。細胞生存率の測定は、第一章第一節-2) の方法に従って MTS 法で解析した。

3) β毒素による THP-1 細胞における ROS の産生

<実験材料>

DCFH-DA の調製 [Sigma-Aldrich, D6883] M.W. 487.29: 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 2.44 mg を無血清 RPMI 1640 培地 50 µl に溶解し、100 mM に調製した。使用時は、無血清 RPMI 1640 培地で 10 倍希釈し、10 mM に調製した液を添加した。(終濃度: 10 µM)

LPS の調製 [Sigma-Aldrich, L4516]: Lipopolysaccharide 1 mg を無血清 RPMI 1640 培地 500 µl で溶解し、2.0 mg/ml とした。細胞処理時に無血清 RPMI 1640 培地で 10 倍希釈し (200 µg/ml)、希釈液を培地 300 µl に対して 1.5 µl 添加した。(終濃度: 1 µg/ml)

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で、6 well プレートに THP-1 細胞を 2×10^5 cells/2.0 ml/well (無血清 RPMI 1640 培地) で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションし、馴化した。DCFH-DA を添加 (終濃度: 10 µM) し、37°C、5% CO₂ の条件下で 10 分間インキュベーションした。次に、洗浄のため、室温で、1,500 rpm で 5 分間遠心し、上清をアスピレーターで除去し、滅菌 PBS (-) 500 µl で細胞を懸濁した。この操作を 3 回繰り返す、上清中の DCFH-DA を除去した。沈殿した細胞は、無血清 RPMI 1640 培地で懸濁し、β毒素 (終濃度: 5 µg/ml)、または、LPS (終濃度: 1 µg/ml) を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションした。その後、全量を 1.5 ml チューブに回収し、室温で 1,500 rpm、5 分間遠心し、上清を除去した。この操作を 2 度行い、沈殿した細胞は HBSS (-) 500 µl で懸濁し、Flow cytometry [Beckman Coulter] で解析した。

<実験成績>

前節で、 β 毒素は細胞内 K^+ 遊離作用を示すことが明らかになった。 β -PFT による細胞内 K^+ 遊離による細胞内 K^+ 濃度の低下は、細胞生存に働く p38 MAPK や JNK シグナルを活性化することが報告されている (101, 102)。本節では、 β 毒素による細胞障害時に、p38 MAPK や JNK シグナルが活性化されるかどうかを検討した。THP-1 細胞に β 毒素 (終濃度: 250 ng/ml) を作用させ、37°C で種々の時間インキュベーションして、p38 MAPK と JNK のリン酸化をそれぞれ特異的なリン酸化抗体を用いて解析した (Fig. 19)。その結果、p38 MAPK は β 毒素処理後 15~90 分 (Fig. 19A) で、JNK は処理後 30~60 分で強いリン酸化が認められた (Fig. 19B)。いずれのシグナルも、その後は減弱した。次に、p38 MAPK と JNK のそれぞれの阻害剤存在下での β 毒素によるリン酸化を測定した。その結果、p38 MAPK のリン酸化は p38 MAPK 阻害剤 SB203580 で、JNK のリン酸化は JNK 阻害剤 SP600125 で、それぞれ抑制された (Fig. 19C, D)。そこで、リン酸化の実験と同様の条件で、SB203580、または、SP600125 で細胞を処理し、本毒素の細胞毒性に対する効果を MTS 法で解析した (Fig. 20A)。その結果、 β 毒素単独処理で 60%の細胞生存率を示す条件で、SB203580、または、SP600125 存在下で β 毒素の細胞毒性が有意に増強され、細胞生存率は約 20%に低下した。以上の結果より、 β 毒素の細胞毒性は、p38 MAPK や JNK の阻害によって増強されることが明らかとなった。p38 MAPK は、細胞内で産生された ROS によるストレスでも活性化されることが報告されている (98)。そこで、 β 毒素が THP-1 細胞の ROS 産生を促進し、p38 MAPK を活性化するかどうかを明らかにするため、活性酸素種に特異的に反応する蛍光プローブ DCFH-DA を細胞内に取り込ませた THP-1 細胞を使用して検討を行った (Fig. 20B)。この実験では、ROS 産生の Positive control として、*E. coli* 由来の LPS を使用した (98)。その結果、Positive control の LPS は、THP-1 細胞の ROS 産生を亢進した。一方、 β 毒素処理 THP-1 細胞では、ROS の産生は認められなかった。ROS の影響をさらに検討するため、ROS のスカベンジャーである N-acetyl cysteine (NAC) で処理した細胞に対する β 毒素の作用を検討した (Fig. 20A)。その結果、NAC 処理しても β 毒素の細胞毒性に変化は認められな

かった。以上の結果より、 β 毒素は ROS 産生を亢進せず、別の経路で p38 MAPK を活性化していることが明らかとなった。

第三節 β毒素の細胞毒性における細胞外 K⁺の役割

前節の結果より、β毒素が感受性細胞に作用すると細胞内 K⁺濃度の低下による p38 MAPK や JNK などの細胞生存に関与するシグナルが活性化され、本毒素の細胞毒性に対して防御的に働くことが明らかとなった。本節では、β毒素による細胞毒性に対する細胞外 K⁺濃度の効果を検討し、本毒素の毒性に対する宿主細胞の抵抗性を解析した。

【実験材料および実験方法】

1) β毒素の細胞毒性における細胞外K⁺の影響

<実験材料>

K⁺-normal buffer

Reagent	Final Conc.	M.W.	g/l
NaCl	140 mM	58.44	8.2
KCl	2.7 mM	74.56	0.2
CaCl ₂	2.3 mM	110.99	0.26
NaHCO ₃	12 mM	84.01	1.00
NaH ₂ PO ₄	0.48 mM	119.98	0.06
HEPES	25 mM	238.31	6.00
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.49 mM	203.3	0.1

K⁺-free buffer

Reagent	Final Conc.	M.W.	g/l
NaCl	140 mM	58.44	8.2
CaCl ₂	2.3 mM	110.99	0.26

NaHCO ₃	12 mM	84.01	1.00
NaH ₂ PO ₄	0.48 mM	119.98	0.06
HEPES	25 mM	238.31	6.00
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.49 mM	203.3	0.1

K⁺-high buffer

Reagent	Final Conc.	M.W.	g/l
NaCl	140 mM	58.44	8.2
KCl	80 mM	74.56	5.96
CaCl ₂	2.3 mM	110.99	0.26
NaHCO ₃	12 mM	84.01	1.00
NaH ₂ PO ₄	0.48 mM	119.98	0.06
HEPES	25 mM	238.31	6.00
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.49 mM	203.3	0.1

上記の組成で滅菌蒸留水に溶解し、1 N NaOH で pH 7.4 に調整した。

使用時には、上記のすべての Buffer 50 ml に、D-Glucose 0.05 g (0.1%) と BSA 0.05 g (0.1%) を溶解し、20 ml のテルモシリンジと Minisart 滅菌フィルター (0.2 μm) でろ過滅菌を行った。

A) 細胞毒性の評価

<実験方法>

本論文の第一章第一節-1) と同様の方法で細胞数を調製した THP-1 細胞を予め使用する Buffer (K⁺-normal buffer, K⁺-free buffer, K⁺-high buffer) 10 ml で 3 回洗浄して使用した。96 well プレートに THP-1 細胞を 1×10⁵ cells/100 μl/well で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションし、馴化した。β毒素 (終濃度: 0.5 μg/ml) を添加して、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 時間インキュベーションした。細

胞生存率の測定は、第一章第一節-2) の方法に従って MTS 法で解析した。

B) β 毒素の結合

<実験方法>

第三章第三節-A) で用いた THP-1 細胞を 48 well プレートに 2×10^5 cells/300 μ l/well で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションし馴化した。その後、 β 毒素（終濃度： 1 μ g/ml）を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベーションした。第一章第一節-3) に従って、SDS-PAGE、Western blotting を行い、LAS-4000 で解析した。

C) p38 MAPK と JNK のリン酸化

<実験材料>

第三章第二節-1) と同様の方法で調製した。

<実験方法>

第三章第三節-A) で用いた THP-1 細胞を 48 well プレートに 2×10^5 cells/300 μ l/well で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間馴化した。その後、 β 毒素（終濃度： 0.5 μ g/ml）を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 0~60 分間インキュベーションした。第一章第一節-3) に従って、SDS-PAGE、Western blotting を行い、LAS-4000 で解析した。

<実験成績>

β -PFT は、感受性細胞膜上で形成したポアから細胞内 K^+ を遊離させ、p38 MAPK シグナルを活性化することが知られている (101, 102)。 β 毒素も同様の作用を有することを前節までに明らかにした。そこで、本毒素の作用における細胞外 K^+ の効果を検討するため、種々の細胞外 K^+ 濃度の培地で調製した THP-1 細胞を使用して、細胞外 K^+ が本毒素の細胞毒性や宿主の生存に関与する p38 MAPK シグナルに対して、どのような役割を演じているかを検討した。まず、THP-1 細胞を K^+ -normal buffer、 K^+ -free buffer、または、 K^+ -high buffer で調製し、 β 毒素を作用させ、MTS 法で細胞生存率を測定した (Fig. 21)。その結果、 K^+ -normal buffer で、 β 毒素により約 60% の細胞が生存する条件で、 K^+ -free buffer 中では約 20% の細胞生存率を示し、本毒素の細胞毒性が増強されることが判明した。これに対して、 K^+ -high buffer では約 98% の細胞生存率を示し本毒素の細胞毒性は阻害された (Fig. 21A)。次に、種々の K^+ 濃度 Buffer の THP-1 細胞に対する β 毒素の結合を抗 β 毒素抗体を用いた Western blotting で解析した (Fig. 21B)。その結果、いずれの Buffer 中でも、本毒素オリゴマーのバンドの濃さに差はなく、細胞外 K^+ 濃度が本毒素の結合に影響しないことが明らかになった。以上より、細胞外 K^+ 濃度が、本毒素の細胞毒性に影響することが明らかになった。そこで、細胞外 K^+ 濃度が、本毒素による p38 MAPK の活性化にどのような影響を示すかを検討するため、種々の Buffer 中で β 毒素 (0.5 μ g/ml) を作用させ、p38 MAPK のリン酸化を Western blotting で解析した (Fig. 21C)。その結果、 K^+ -normal buffer 中では 15 分からリン酸化が認められ、60 分で最も強いシグナルを示した。一方、 K^+ -free buffer 中において、p38 MAPK のリン酸化は、 β 毒素処理後 5 分で認められ、60 分まで時間依存的にかなり強いリン酸化が認められた。これに対して、 K^+ -high buffer 中で検討すると、本毒素による p38 MAPK のリン酸化は全く認められなかった。以上の結果より、細胞外 K^+ 濃度が、本毒素による p38 MAPK のリン酸化に影響を与えることが明らかとなった。

第四節 考察および小括

<考察>

β 毒素は、C型菌からモノマーで分泌され、感受性細胞膜上でオリゴマー、そして、機能的なポアを形成して細胞毒性を示す β -PFTファミリーに属している(21, 57)。 β -PFTは宿主細胞においてポアを形成後、細胞内 K^+ を細胞外へ遊離させ、細胞内 K^+ 濃度が低下すると、これが引き金となりp38 MAPKやJNKのリン酸化を誘導する(101, 102)。これらの活性化は宿主細胞の生存シグナルとして働き、細胞毒性に抵抗していることが知られている(97-102)。本章では、 β 毒素作用時における宿主細胞の防御機構について検討した。

β 毒素をTHP-1細胞に作用させ、細胞外への K^+ 遊離を測定した。その結果、 β 毒素は、濃度と時間依存的に細胞内 K^+ を細胞外へ遊離させることが判明した。所属する研究室では、HL-60細胞に β 毒素を作用させると、細胞膜脂質ラフト上で機能的なポアを形成し、細胞内 K^+ を細胞外へ遊離させることを報告し(57)、今回のTHP-1細胞でも同様の結果が得られ、 β 毒素は、感受性細胞に対してポアを形成して、同様のメカニズムで毒性を示すと考えられる。これまでに、 K^+ の細胞外遊離による細胞内 K^+ 濃度の低下は、p38 MAPKの活性化を誘導し、これらの活性化は、宿主細胞のストレス防御機構として働くことが知られている(101, 102)。そこで、 β 毒素処理THP-1細胞におけるp38 MAPKシグナルの活性化を調べると、両者とも β 毒素処理後、15～60分でリン酸化され、活性化が認められた。このリン酸化はp38 MAPK阻害剤SB203580で抑制され、さらに、p38 MAPK阻害剤は本毒素の毒性を増強した。一方、MAPKシグナルの活性化因子の一つとして、活性酸素種ROSの産生が知られている(98)。そこで、 β 毒素の作用におけるROSの役割を検討すると、 β 毒素処理THP-1細胞において、ROSの産生は認められず、また、ROSの阻害剤であるNACを処理しても、 β 毒素の細胞毒性は変化しなかった。以上より、 β 毒素によるp38 MAPKやJNKの活性化は、ROS産生を介していないことが判明した。

細胞外 K^+ 濃度は β -PFTの作用に影響を与えることが知られている。例えば、細胞

外 K^+ が高濃度の場合、細胞外への K^+ の遊離が阻害され、 β -PFT による細胞毒性が抑制されることが報告されている (100, 101, 103)。本研究において、細胞外 K^+ が高濃度な培地 (K^+ -high buffer) では、 β 毒素の結合は影響を受けないが p38 MAPK 活性化が抑制された。この結果より、 K^+ 遊離が抑制される K^+ -high buffer の条件下では、本毒素による K^+ 遊離が抑制されると考えられ、宿主防御シグナルである p38 MAPK の活性化は起こらないことが判明した。一方、 K^+ -free buffer 中では、 β 毒素の細胞毒性が増強され、p38 MAPK の活性化が誘導された。 K^+ -free buffer 中では、 β -PFT の作用により、 K^+ -normal buffer よりも容易に K^+ 遊離が起こることが知られている (104)。この結果からも、 β 毒素のポアからの K^+ 遊離による細胞内 K^+ 濃度低下が、p38 MAPK の活性化を誘導していることが支持される。

p38 MAPK と同じ MAPK ファミリーで生存シグナルとして働くことが知られている JNK シグナル系が免疫細胞においてストレスに応答して活性化されることが知られている (105)。JNK シグナルは、p38 MAPK よりも広範囲のストレスを認識して生存シグナルとして応答することが報告されている (101)。本研究において、 β 毒素は JNK のリン酸化を誘導した。このリン酸化は JNK 阻害剤 SP600125 で阻害され、さらに、この阻害剤は本毒素の細胞毒性を増強した。以上より、 β 毒素の細胞障害時に、宿主細胞は p38 MAPK と JNK シグナル伝達系の両方を活性化させ、宿主の防御因子として働くことが判明した。

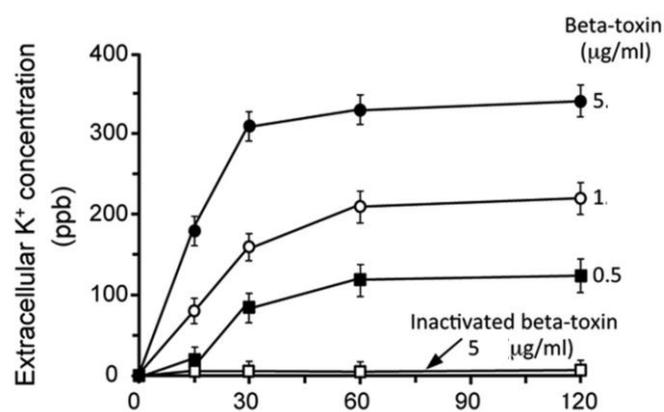
MAPK ファミリーのシグナル伝達系は、脂質産生を亢進させる経路を誘導して細胞膜障害の修復に関与することや細胞内のイオンホメオスタシスを制御して細胞生存や環境ストレスへの適応等に関与することが報告されている (101)。さらに、上皮系細胞は、 β -PFT による細胞障害や外界からの浸透圧ストレスなどに対して、p38 MAPK の活性化を誘導して対応することから、本来、細胞に備わった自然免疫応答の一つとして宿主細胞の生存シグナルが存在すると報告された (99)。これを支持する報告として、感染初期に少量の β -PFT が、上皮系細胞に作用することによって、宿主細胞は軽度の炎症状態を誘発し、自然免疫応答の感度を高め感染に対して防御的に働いている報告がある (101)。これらの知見は、上皮細胞表面における病原体に対する宿主の自然免疫が効果的に発動していることを示している。以上の宿主細胞のストレ

スシグナルを感知するシステムは、上皮細胞の自然免疫応答において新規な経路である。本研究で、著者は、 β 毒素による THP-1 細胞の MAPK シグナルの活性化を示した。今後、 β 毒素と p38 MAPK、または、JNK の活性化メカニズムについてさらに検討が必要であるが、 β 毒素の細胞毒性に対抗する新規な宿主防御システムの発見により、新たな防御システムを解明する糸口が得られる可能性がある。一方、 β 毒素の治療戦略の一つとして、MAPK ファミリーを増強するような因子が、治療のターゲットになる可能性がある。

<小括>

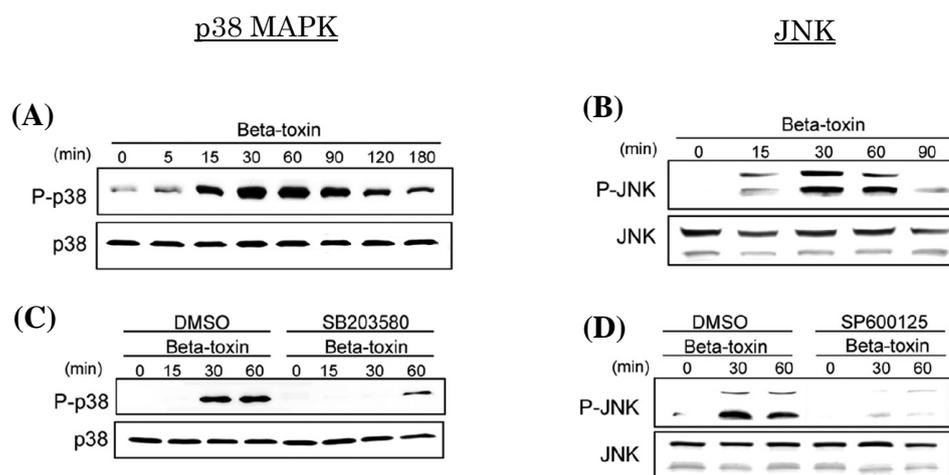
β 毒素は、THP-1 細胞から K^+ の流出を誘導し、細胞内 K^+ 濃度を低下させ、p38 MAPK や JNK シグナルを活性化する。これらの活性化は、 β 毒素の細胞毒性に対抗する宿主の生存シグナルに必須なシグナルで、本毒素の細胞障害時に宿主細胞は、抵抗因子として生存シグナルを活性化することが初めて明らかになった。

Fig. 18 Effect of beta-toxin on K⁺ release from THP-1 cells.



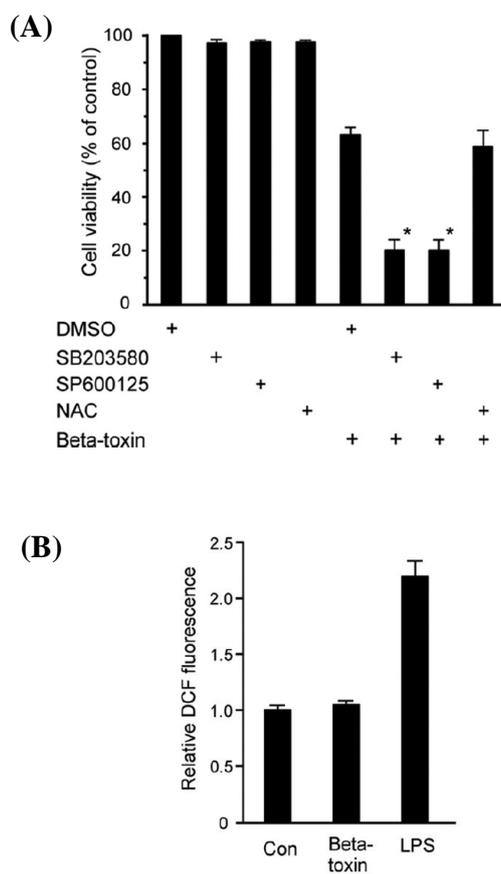
Beta-toxin-induced K⁺ release from THP-1 cells. THP-1 cells were incubated with beta-toxin at 37°C. K⁺ concentrations in the medium were determined at given times by atomic absorption spectrometry. Data are the means \pm SD from four independent experiments.

Fig. 19 Phosphorylation of p38 MAPK and JNK in THP-1 cells treated with beta-toxin.



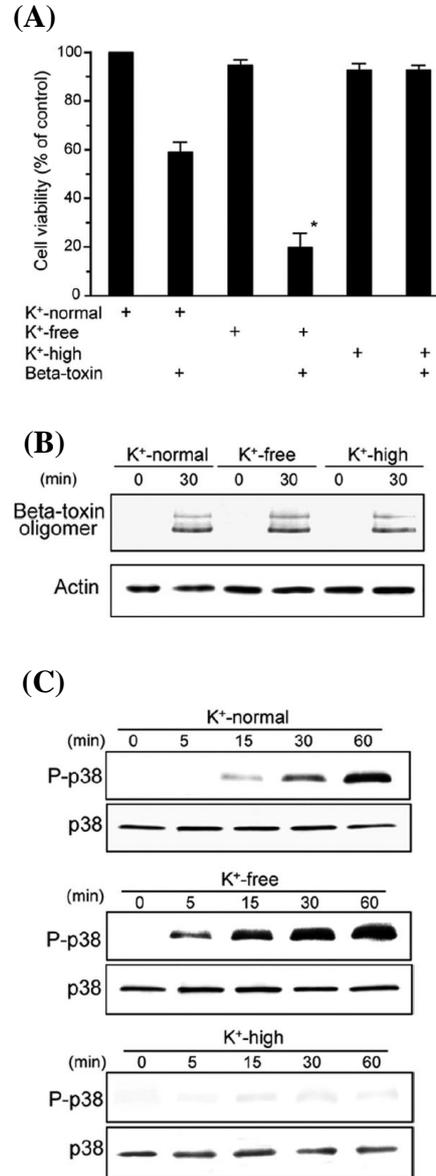
(A and B) THP-1 cells were incubated with beta-toxin (0.5 $\mu\text{g/ml}$) for the indicated time periods. P-p38 and P-JNK, phosphorylated p38 MAPK and JNK, respectively. (C and D) THP-1 cells treated with DMSO, 10 μM SB203580 (C), or 10 μM SP600125 (D) at 37°C for 60 min were incubated with beta-toxin (0.5 $\mu\text{g/ml}$) for the indicated time periods. Cells were subsequently lysed and detected by Western blotting using specific antibodies. Typical results from one of four experiments are shown.

Fig. 20. Effect of MAPK inhibitors and ROS scavenger on beta-toxin-caused cell death.



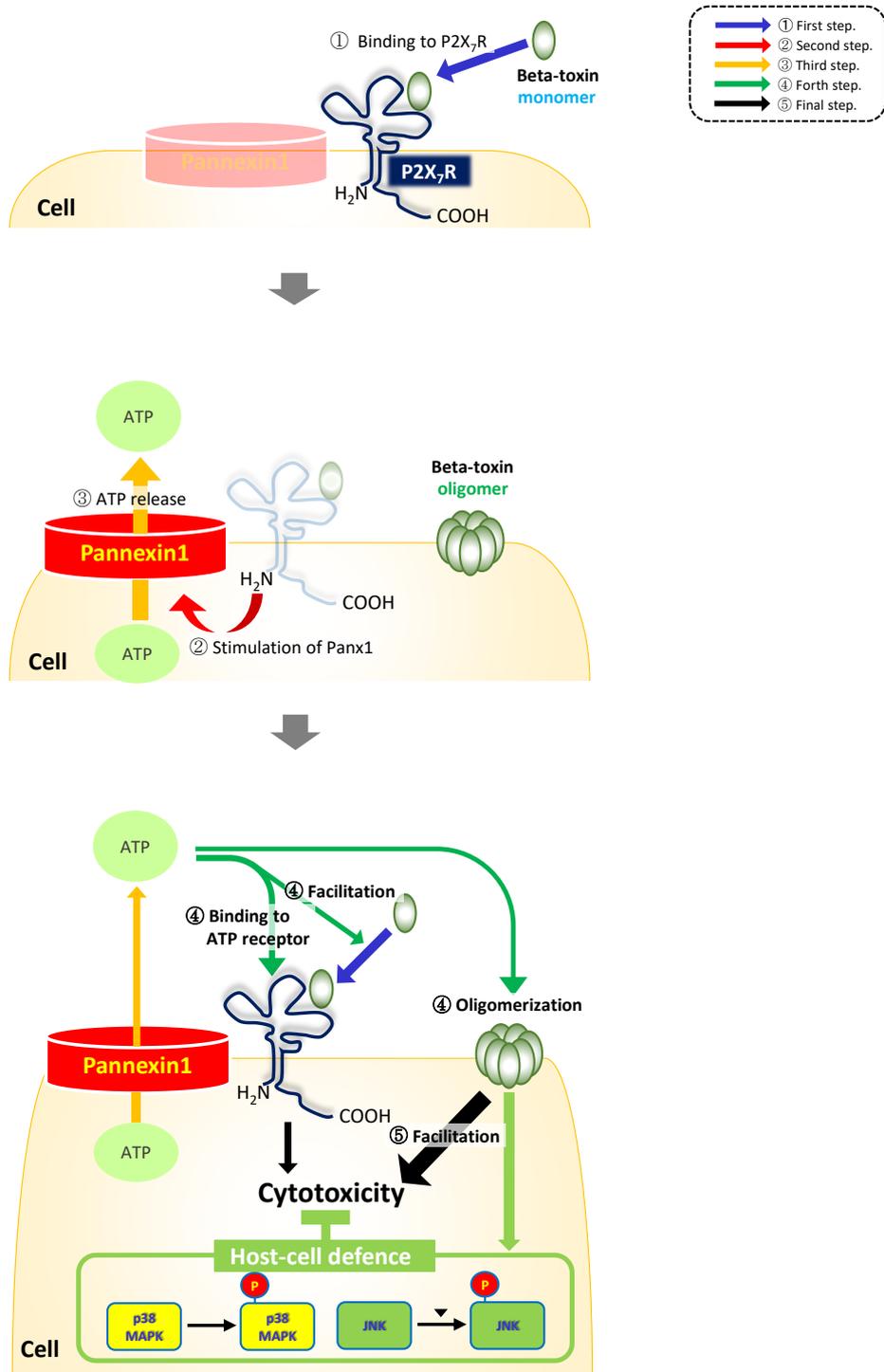
(A) THP-1 cells treated with DMSO, 10 μ M SB203580, 10 μ M SP600125, or 2.5 mM NAC at 37°C for 60 min were treated with beta-toxin (0.5 μ g/ml) at 37°C for 4 h. Cell viability was determined via an assay with MTS. Data are reported as percentages of the values obtained with untreated controls (means \pm SD from four independent experiments). Significant differences (Student's t-test) from control cells are indicated. * P < 0.01, which is significantly different from DMSO plus beta-toxin. (B) THP-1 cells were treated with beta-toxin (5 μ g/ml) or with LPS (1 μ g/ml) at 37°C for 30 min. Intracellular ROS levels were then determined by flow-cytometric analysis of DCF fluorescence. Data are the means \pm SD from four independent experiments. Con, control.

Fig. 21 Effect of extracellular potassium levels on cytotoxicity, p38 MAPK phosphorylation, and binding of the toxin in THP-1 cells treated with beta-toxin.



(A) THP-1 cells were incubated either in K⁺-normal, K⁺-free, or K⁺-high medium with beta-toxin (0.5 μg/ml) at 37°C. After incubation for 4 h, cell viability was determined via an assay with MTS. Data are reported as percentages of the values obtained with untreated controls (means ± SD from four independent experiments). Significant differences (Student's t-test) from control cells are indicated. An asterisk indicates **P* < 0.01, significantly different from K⁺-normal medium plus beta-toxin. (B) THP-1 cells were incubated with beta-toxin (1 μg/ml) at 37°C for 30 min. Cells were subsequently lysed, and beta-toxin and β-actin (control) were detected by Western blotting using specific antibodies. A typical result from one of three experiments is shown. (C) After incubation with beta-toxin (0.5 μg/ml) for the indicated time periods, cells were subsequently lysed, and phosphorylated p38 MAPK and p38 MAPK were detected by Western blotting using specific antibodies. Typical results from one of four experiments are shown.

Fig. 22 The cytotoxic mechanism of *C. perfringens* beta-toxin.



第四章 総括および結論

[総括]

C型ウエルシュ菌は、経口的に侵入しヒトや動物に対して致死率の高い壊疽性腸炎を引き起こす。C型菌感染症の主要病原因子であるβ毒素は、β-PFTファミリーに属するオリゴマー形成毒素である(21, 57)。C型菌が空腸で増殖し、産生されたβ毒素は、空腸の粘膜固有層内に侵入して血管内皮細胞の障害を起こし、壊疽性腸炎を引き起こす報告があるが(48-51)、その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。著者は、β毒素の細胞に対する毒性メカニズムを明らかにすることは、本感染症発症における本毒素の役割の解明につながると考えた。本研究では、まず、未だ明らかにされていないβ毒素のレセプター探索を行った。さらに、そのレセプターに関連した毒性メカニズムに関わる分子の同定や役割、そして、宿主細胞の本毒素に対する抵抗性因子などを検討した。以上の検討から、β毒素の作用メカニズムを明らかにし、C型菌感染症の有力な治療法の開発の糸口となる可能性を検討した。

著者は、まず、β毒素が細胞に対して最初に作用する分子であるレセプターの同定を行った。本毒素のレセプターの候補としてP2XRに着目した。その理由は、β毒素と同じβ-PFTファミリーの*S. aureus* α-toxinがP2XRを介して毒性を発現すること(61)、β毒素が感受性を示す細胞である免疫系細胞にP2XRが多く発現していること(62)、そして、P2XRは腸管上皮細胞にも多く存在し腸炎に関与すること(63)などが挙げられる。まず、P2XR阻害剤やP2X₇R選択的阻害剤を処理したTHP-1細胞にβ毒素を作用させると、いずれの阻害剤もβ毒素の細胞毒性を抑制した。特に、P2X₇R選択的阻害剤o-ATPがβ毒素の細胞毒性を強く抑制したことから、o-ATPを処理したTHP-1細胞へのβ毒素の結合を解析すると、o-ATPはβ毒素の細胞への結合を阻害した。以上より、β毒素は感受性細胞のP2X₇Rに結合する可能性が示唆された。そこで、P2X₇Rのノックダウンを行うと、P2X₇Rノックダウン細胞ではβ毒素の細胞毒性と細胞への結合が阻害された。以上より、β毒素はP2X₇Rを介して細胞に結合すると考えられる。THP-1細胞には、P2X₇Rと同じATPRファミリーのP2Y₂RとP2Y₆R

が発現していると報告されている (74)。β毒素の毒性発現における両者の役割を確認するため、P2Y₂R と P2Y₆R をそれぞれノックダウンし、β毒素の細胞毒性を検討すると、P2Y₂R や P2Y₆R をノックダウンしても、本毒素の細胞毒性に変化は認められなかった。以上より、β毒素は P2YR ファミリーの中で P2Y₂R や P2Y₆R には作用せず、P2X₇R に選択的に作用して毒性を示すことが明らかになった。次に、β毒素に非感受性で P2X₇R を発現していない HEK293 細胞 (106) にクローニングした P2X₇R 遺伝子をトランスフェクトし、P2X₇R を強制発現させ (P2X₇R-HEK293 細胞)、β毒素の作用を検討すると、本毒素はこの細胞に結合し、さらに細胞毒性を示した。P2X₇R は活性化すると、細胞外の Ca²⁺を細胞内に流入させることが知られている (75)。そこで、β毒素の毒性発現における P2X₇R の役割を検討するため、P2X₇R-HEK293 細胞にβ毒素を作用させると、本毒素は細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こした。一方、本毒素による P2X₇R-HEK293 細胞への Ca²⁺流入は、P2X₇R アゴニストである Bz-ATP と比較して弱いことが判明した。以上より、β毒素は P2X₇R に結合して、作用は弱いが活性化していることが明らかになった。Autheman と Wyder は、細胞内 Ca²⁺キレーターの BAPTA-AM 処理により、β毒素による細胞毒性や細胞死が抑制されることを報告しており (52)、本毒素の P2X₇R の活性化による Ca²⁺の流入がβ毒素の毒性に関与する結果とよく一致する。一方、β毒素ポアからの Ca²⁺の取り込み促進の可能性も考えられ、β毒素による Ca²⁺流入作用は、今後検討が必要である。次に、β毒素と P2X₇R の直接的な結合を Dot-blot 法で解析すると、β毒素はドットした P2X₇R に結合した。そして、本毒素の P2X₇R への特異性を検討するため、同じ P2XR ファミリーの P2X₃R や P2X₅R で同様の方法で検討すると、β毒素はこれらタンパク質とは結合しなかった。さらに、Dot-blot 法による P2X₇R とβ毒素の結合は P2X₇R 阻害剤により抑制された。以上より、β毒素と P2X₇R は特異的に結合することが明らかとなった。

次に、THP-1 細胞表面でのβ毒素と P2X₇R の局在を調べると、細胞膜上で両者は約 40%の共局在を示した。さらに、β毒素の細胞膜への結合は P2X₇R 阻害剤で阻害された。β毒素の毒性発現において、脂質ラフトは重要な役割を担っており、本毒素はラフトでオリゴマーを形成することが報告されている (57)。今回の検討でも、β毒

素と P2X₇R は脂質ラフトに局在していた。以上より、β毒素と P2X₇R は、細胞膜上の脂質ラフトで結合し、その後、両者は離れ、β毒素は細胞膜に結合し、ポアを形成すると考えられる。以上より、P2X₇R はβ毒素のレセプターの一つとして、機能していることが明らかとなった。

現在まで、P2XR ファミリーの立体構造は、ヒトの P2X₃R (107) とゼブラフィッシュの P2X₄R (108, 109)、そして、P2X₇R (110) で解明されている。これら P2XR ファミリーの ATP 結合ポケットには、ATP の結合に関与すると推定されるアミノ酸 (Lys, Arg, Asn) が存在し、それらアミノ酸はその他の P2XR ファミリー中でも保存されていた (109, 111)。これらの報告から、P2XR ファミリーのいずれのサブタイプでも類似の構造の ATP 結合ポケットを有すると推定される。今後、β毒素が P2X₇R の細胞外ドメインのいずれの領域を認識して結合するかを検討し、本毒素が ATP 結合ポケットと相互作用するのか、または、その他の領域を認識するのかを明らかにする。

β毒素のマウス致死活性における P2X₇R の役割について検討すると、P2X₇R 阻害剤 BBG をマウスに前投与しβ毒素を投与すると、致死時間が有意に遅延された。これまで、β毒素によるマウス致死作用のメカニズムは不明であったが、今回の検討により、P2X₇R は、β毒素の致死作用において重要な役割を担っていることが判明した。すなわち、P2X₇R 阻害剤がβ毒素の致死作用を抑制したことから、C 型菌感染症の治療において、新規なターゲットとして P2X₇R が候補となり、このレセプターを阻害する薬剤が新しい治療薬になる可能性がある。

P2X₇R は ATP 遊離チャンネルとして知られている Panx1 と共役しており、両者は互いの機能発現において関連する重要な分子である (81, 82)。Panx1 は全身にユビキタスに存在しているが、主に免疫系細胞に多く存在しその活性化 (112) や炎症の誘発 (112) 等に関与しており、近年、腸管上皮にも Panx1 が存在し腸炎に Panx1 が関与する報告もある (88, 89)。そこで、β毒素の P2X₇R 作用後の詳細な毒性シグナルを解析するため、Panx1 に着目し検討を行った。まず、Panx1 選択的阻害剤や阻害ペプチドはβ毒素の細胞毒性を抑制した。次に、最も毒性抑制効果が強かった Panx1 選択的阻害剤 CBX は、β毒素の結合を阻害しなかった。以上より、Panx1 はβ毒素

の結合に関与するのではなく、本毒素の細胞毒性発現のいずれかのステップに関与する可能性が考えられる。そこで、Pannx1 をノックダウンした THP-1 細胞で検討すると、この細胞に対して本毒素は細胞毒性を示さなかった。さらに、Pannx1 ノックダウン細胞ではβ毒素のモノマーの結合が多く、オリゴマーは少なかった。以上の結果より、Pannx1 はβ毒素の結合には影響しないが、本毒素が細胞膜上でモノマーからオリゴマーを形成する際に関与し、オリゴマー形成が少ないため細胞毒性が認められないと考えられる。そこで、β毒素と Pannx1 の結合の可能性を、Dot-blot 法で調べると、β毒素と Pannx1 の結合は認められず、両者は直接結合しないことが判明した。これまでの結果より、β毒素は Pannx1 に結合しないが宿主細胞の Pannx1 シグナルを介して細胞毒性を示すと考えられる。Pannx1 は活性化するとそのチャネルから細胞外へ ATP を遊離することが報告されている (85, 86)。そこで、β毒素作用時の細胞外への ATP 遊離を測定すると、β毒素処理 5~15 分で一過性の ATP 遊離が認められ、細胞毒性が強くなる 60 分において大量の ATP 遊離が認められた。初期の一過性 ATP 遊離と後期の ATP 遊離は、いずれも CBX で抑制されたことから、Pannx1 を介して遊離する一過性の ATP 遊離がその後の細胞毒性発現に強く関わっていると考えられる。本毒素による初期の 5~15 分の一過性 ATP 遊離では、β毒素のモノマーが多く、オリゴマーの形成は少ない。一方、本毒素処理後 60 分での ATP 大量遊離時ではオリゴマーが多く認められ、本毒素のオリゴマーによる細胞膜破壊により ATP が遊離したと考えられる。しかしながら、ATP 遊離は Pannx1 チャネルの他にβ毒素のポアから遊離する可能性がある。そこで、β毒素が膜破壊作用を示す DOPC-Chol リポソームに ATP や CF を封入し、β毒素を作用させると、β毒素は THP-1 細胞で認められた初期の ATP や CF 遊離を示さず、本毒素処理後 60 分において ATP と CF の遊離が認められた。この条件でβ毒素の結合を検討すると、初期ではモノマーの結合がほとんどで、60 分ではオリゴマー形成が多く認められ、β毒素オリゴマーによる膜破壊作用によって ATP と CF が遊離することが判明した。以上より、β毒素は、Pannx1 チャネルを活性化して、初期の一過性 ATP 遊離を引き起こすと考えられる。次に、本毒素による Pannx1 活性化により遊離した ATP が、その後、本毒素の細胞毒性にどのような影響を与えるかを検討した。β毒素の作用に対する ATPase である Apyrase や

Hexokinase の効果を調べると、毒素添加 10 分前に ATPase を添加した場合、 β 毒素の細胞毒性は抑制された。一方、毒素添加 10 分後に ATPase を添加した場合は細胞毒性は抑制されなかった。以上より、 β 毒素により一過性の Panx1 の活性化によって遊離された ATP は、その後、本毒素の毒性増強に必要な因子であると考えられる。そこで、遊離した ATP が β 毒素の細胞への結合や細胞毒性に与える影響を調べると、外因的に ATP を添加することにより、 β 毒素のモノマーやオリゴマーの結合が増加し、細胞毒性も増強された。すなわち、 β 毒素が Panx1 を刺激して細胞外に遊離した ATP は、本毒素の結合とオリゴマー形成を促進し、その結果、細胞毒性を増強すると考えられる。以上の結果より、 β 毒素は P2X₇R に結合後、共役した Panx1 を活性化し、そのチャンネルから一過性の ATP 遊離を引き起こす。遊離した ATP は、 β 毒素の結合やオリゴマー化を促進し、 β 毒素の細胞毒性を増強することが明らかとなった。Panx1 は腸管にも豊富に存在することから、Panx1 阻害により C 型菌感染症の重症化を抑制する可能性が示唆され、本感染症治療の有効なターゲット分子の可能性が期待される。

本毒素と同じ β -PFT ファミリーの毒素である *S. aureus* alpha-toxin (61, 62, 113)、*E. coli* alpha-hemolysin (64, 87, 114)、そして、*A. actinomycetemcomitans* leukotoxin (69, 114) は細胞膜上でオリゴマーとなりポアを形成して、ポアから遊離した ATP が P2X₇R を含む P2XR を活性化し、細胞毒性を示すことが報告されている。しかし、これら毒素が P2XR に対して直接相互作用しているのか、また、P2XR がどのようなメカニズムで細胞毒性に関与しているのかは明らかにされていない。今回の検討で、初めて β 毒素が P2X₇R に結合して Panx1 を活性化し、遊離した ATP が毒性に関与することを明らかにした。現在まで知られている P2X₇R の内因性リガンドは ATP のみであり、本毒素と P2X₇R の相互作用を解析することで、P2X₇R の新規な機能が明らかになる可能性が考えられる。

Panx1 は P2X₇R と共役関係にあり、細胞膜上で両者は複合体を形成し ATP のシグナル伝達に関与することが報告されている (115)。しかし、P2X₇R を介した Panx1 の活性化機構の詳細は明らかにされていない。今回の検討で、 β 毒素は Panx1 を一過性に活性化し、さらに、Panx1 に直接結合しなかったことから、 β 毒素が直接 Panx1

と相互作用して活性化している可能性は低いと考えられる。Panx1 を活性化するシグナルは複数知られており、(i) 細胞内 Ca^{2+} の増加による活性化、(ii) 活性型 Caspase1 による Panx1 の C 末切断による不可逆的活性化等が知られている。今後、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化について検討する予定である。さらに、本毒素は THP-1 細胞に対して、Panx1 の Caspase1 による活性化も検討する必要がある。一方、今回の検討で本毒素が P2X₇R を介して Panx1 の活性化を起こす詳細は不明である。最近報告された P2X₇R の立体構造から、P2X₇R 選択的阻害剤が P2X₇R の細胞外ドメインの ATP 結合部位とは別の特定の部位に結合して、阻害することが明らかとなった。これらのことにより、 β 毒素が P2X₇R のいずれの領域と相互作用するかが明らかになる可能性があり、本毒素が P2X₇R に作用後、どのような過程で Panx1 を活性化するかが明らかになると推察される。

β 毒素が属する β -PFT は産生菌からモノマーで遊離され、感受性細胞膜上でオリゴマー、そして、ポアを形成し、細胞毒性を示す。一方、宿主細胞は β -PFT による攻撃やストレスなどの外界からの障害に対して抵抗するため、障害時に p38 MAPK や JNK などのストレス応答性シグナルを発動することが報告されている (101, 102)。そこで、 β 毒素が作用したときの宿主細胞の p38 MAPK や JNK の活性化を解析した。これまでの報告で、 β -PFT は自身が形成するポアにより細胞内 K^{+} が細胞外へと遊離することにより、細胞内 K^{+} 濃度が低下し、それがストレスのセンサーとなり p38 MAPK や JNK シグナルを活性化することが報告されている (101, 102)。本研究において、 β 毒素は THP-1 細胞から K^{+} 遊離を引き起こした。次に、 β 毒素処理した細胞では p38 MAPK と JNK が一過性に強く活性化された。さらに、p38 MAPK 阻害剤、または、JNK 阻害剤の処理で β 毒素の細胞毒性が増強した。以上より、 β 毒素の細胞毒性に対して、宿主細胞は p38 MAPK や JNK を活性化し障害に対して抵抗することが明らかになった。p38 MAPK や JNK は細胞内の ROS 産生によるストレスで活性化されることが報告されている (98)。しかしながら、ROS スカベンジャーの NAC を処理しても、 β 毒素の細胞毒性は抑制されず、さらに、 β 毒素処理時に ROS 産生は認められなかった。以上より、 β 毒素による p38 MAPK と JNK の活性化に ROS は関与しないことが明らかとなった。次に、本毒素の細胞毒性における細胞外 K^{+} の役

割について解析した。K⁺-high buffer では、β毒素の細胞毒性と p38 MAPK 活性化が抑制された。一方、K⁺-free buffer では、β毒素の細胞毒性と、p38 MAPK は増強された。以上の結果より、β毒素が細胞を攻撃した時の、宿主細胞の抵抗因子として働く p38 MAPK 活性化に細胞外 K⁺が影響することが明らかとなった。一方、感染初期において少量のβ-PFT が上皮系細胞に作用することで、宿主細胞は軽度の炎症状態を誘発し、自然免疫応答の感度を高め防御に働いている報告がある (102)。このような、宿主細胞のストレスシグナルを感知する経路は、粘膜の自然免疫応答において新規な経路であると考ええる。β毒素の細胞毒性に対抗する新規な宿主防御システムの発見により、新たな生態防御システムを解明する糸口が得られる可能性がある。一方、β毒素の治療戦略の一つとして、MAPK ファミリーを増強するような因子が、治療のターゲットになる可能性がある。

[結論]

ウエルシュ菌β毒素は、感受性細胞の脂質ラフトにおいて P2X₇R に結合後、何らかの刺激を介して Panx1 を一過性に活性化する。すなわち、今回初めてβ毒素のレセプターの一つを同定した。活性化した Panx1 は細胞内 ATP を細胞外に遊離し、この ATP は本毒素の細胞への結合やオリゴマー化を促進し、β毒素の細胞毒性に関与することが明らかとなった。その一方で、β毒素が作用する宿主細胞は、β毒素の毒性に抵抗してストレス応答シグナルである p38 MAPK や JNK シグナルを活性化することが明らかとなった。

引用文献

1. Brooks ME, Sterne M, & Warrack GH (1957) A reassessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. *J. Pathol. Bacteriol.* 74(1):185-195.
2. Sakurai J (1995) Toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Med. Microbiol.* 6(3):175-185.
3. Sakurai J, Nagahama M, & Ochi S (1997) Major toxins of *Clostridium perfringens*. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 16(4):195-214.
4. Smedley JG, 3rd, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, & McClane BA (2004) The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152:183-204.
5. Foster WD (1966) The bacteriology of necrotizing jejunitis in Uganda. *East Afr. Med. J.* 43(11):550-553.
6. Wright DH & Stanfield JP (1967) Enteritis necroticans in Uganda. *J. Pediatr.* 71(2):264-268.
7. Renwick SB, McGovern VJ, & Spence J (1966) Necrotizing enterocolitis: a report of six cases. *Med. J. Aust.* 2(9):413-417.
8. Kellert E & Meeler W (1953) Fatal gastroenteritis associated with *Clostridium welchii*. *Am. J. Clin. Pathol.* 23(12):1234-1237.
9. Murrell TG & Roth L (1963) Necrotizing jejunitis: a newly discovered disease in the highlands of New Guinea. *Med. J. Aust.* 50(1):61-69.
10. Johnson S, Echeverria P, Taylor DN, Paul SR, Coninx R, Sakurai J, Eampokalap B, Jimakorn P, Cooke RA, Lawrence GW, & et al. (1987) Enteritis necroticans among Khmer children at an evacuation site in Thailand. *Lancet* 2(8557):496-500.
11. Matsuda T, Okada Y, Inagi E, Tanabe Y, Shimizu Y, Nagashima K, Sakurai J, Nagahama M, & Tanaka S (2007) Enteritis necroticans 'pigbel' in a

- Japanese diabetic adult. *Pathol. Int.* 57(9):622-626.
12. Amimoto K, Noro T, Oishi E, & Shimizu M (2007) A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology* 153(Pt 4):1198-1206.
 13. Ngamwongsatit B, Tanomsridachchai W, Suthienkul O, Urairong S, Navasakuljinda W, & Janvilisri T (2016) Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. *Anaerobe* 38:88-93.
 14. Egerton JR & Walker PD (1964) THE ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TYPE C FROM NECROTIC ENTERITIS OF MAN IN PAPUA-NEW GUINEA. *J. Pathol. Bacteriol.* 88:275-278.
 15. Lawrence G & Cooke R (1980) Experimental pigbel: the production and pathology of necrotizing enteritis due to *Clostridium welchii* type C in the guinea-pig. *Br. J. Exp. Pathol.* 61(3):261-271.
 16. Fisher DJ, Fernandez-Miyakawa ME, Sayeed S, Poon R, Adams V, Rood JI, Uzal FA, & McClane BA (2006) Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. *Infect. Immun.* 74(9):5200-5210.
 17. Sayeed S, Uzal FA, Fisher DJ, Saputo J, Vidal JE, Chen Y, Gupta P, Rood JI, & McClane BA (2008) Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Mol. Microbiol.* 67(1):15-30.
 18. Fernandez-Miyakawa ME, Fisher DJ, Poon R, Sayeed S, Adams V, Rood JI, McClane BA, & Uzal FA (2007) Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infect. Immun.* 75(3):1443-1452.
 19. Griner LA & Johnson HW (1954) *Clostridium perfringens* type C in

- hemorrhagic enterotoxemia of lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 125(929):125-127.
20. Murrell TG, Egerton JR, Rampling A, Samels J, & Walker PD (1966) The ecology and epidemiology of the pig-bel syndrome in man in New Guinea. *J. Hyg. (Lond.)* 64(3):375-396.
 21. Nagahama M, Ochi S, Oda M, Miyamoto K, Takehara M, & Kobayashi K (2015) Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins (Basel)* 7(2):396-406.
 22. Nagahama M, Ohkubo A, Oda M, Kobayashi K, Amimoto K, Miyamoto K, & Sakurai J (2011) *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. *Infect. Immun.* 79(2):905-910.
 23. Nagahama M, Ohkubo A, Kinouchi Y, Kobayashi K, Miyamoto K, Takehara M, & Sakurai J (2015) *Clostridium perfringens* TpeL Induces Formation of Stress Fibers via Activation of RhoA-ROCK Signaling Pathway. *Biol. Pharm. Bull.* 38(5):732-739.
 24. Nijland R, Lindner C, van Hartskamp M, Hamoen LW, & Kuipers OP (2007) Heterologous production and secretion of *Clostridium perfringens* beta-toxoid in closely related Gram-positive hosts. *J. Biotechnol.* 127(3):361-372.
 25. Nijland R, Heerlien R, Hamoen LW, & Kuipers OP (2007) Changing a single amino acid in *Clostridium perfringens* beta-toxin affects the efficiency of heterologous secretion by *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5):1586-1593.
 26. Bidwell E (1950) Proteolytic enzymes of *Clostridium welchii*. *Biochem. J.* 46(5):589-598.
 27. Sakurai J & Duncan CL (1977) Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. *Infect. Immun.* 18(3):741-745.
 28. Sakurai J & Fujii Y (1987) Purification and characterization of *Clostridium*

- perfringens* beta toxin. *Toxicon* 25(12):1301-1310.
29. Hunter SE, Brown JE, Oyston PC, Sakurai J, & Titball RW (1993) Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 61(9):3958-3965.
 30. Steinhorsdottir V, Fridriksdottir V, Gunnarsson E, & Andresson OS (1995) Expression and purification of *Clostridium perfringens* beta-toxin glutathione S-transferase fusion protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 130(2-3):273-278.
 31. Nagahama M, Kihara A, Miyawaki T, Mukai M, Sakaguchi Y, Ochi S, & Sakurai J (1999) *Clostridium perfringens* beta-toxin is sensitive to thiol-group modification but does not require a thiol group for lethal activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1454(1):97-105.
 32. Sakurai J, Fujii Y, & Matsuura M (1980) Effect of oxidizing agents and sulfhydryl group reagents on beta toxin from *Clostridium perfringens* type C. *Microbiol. Immunol.* 24(7):595-601.
 33. Sakurai J, Fujii Y, & Nagahama M (1992) Effect of p-chloromercuribenzoate on *Clostridium perfringens* beta toxin. *Toxicon* 30(3):323-330.
 34. Manich M, Knapp O, Gibert M, Maier E, Jolivet-Reynaud C, Geny B, Benz R, & Popoff MR (2008) *Clostridium perfringens* delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and *Staphylococcus* pore-forming toxins, but shows functional differences. *PLoS One* 3(11):e3764.
 35. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, & Moore RJ (2008) NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4(2):e26.
 36. Bhakdi S & Tranum-Jensen J (1991) Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*.

- Microbiol. Rev.* 55(4):733-751.
37. Menestrina G, Serra MD, & Prevost G (2001) Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the *Staphylococcal* alpha-hemolysin family. *Toxicon* 39(11):1661-1672.
 38. Walker B & Bayley H (1995) Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of *Staphylococcal* alpha-hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J. Biol. Chem.* 270(39):23065-23071.
 39. Steinhorsdottir V, Fridriksdottir V, Gunnarsson E, & Andresson OS (1998) Site-directed mutagenesis of *Clostridium perfringens* beta-toxin: expression of wild-type and mutant toxins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 158(1):17-23.
 40. Yan XX, Porter CJ, Hardy SP, Steer D, Smith AI, Quinsey NS, Hughes V, Cheung JK, Keyburn AL, Kaldhusdal M, Moore RJ, Bannam TL, Whisstock JC, & Rood JI (2013) Structural and functional analysis of the pore-forming toxin NetB from *Clostridium perfringens*. *MBio* 4(1):e00019-00013.
 41. Sakurai J & Nagahama M (2006) *Clostridium perfringens* beta-toxin : Characterization and action. *Toxin Review* 25(1):89-108.
 42. Tweten RK (2001) *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Vet. Microbiol.* 82(1):1-9.
 43. Sakurai J, Nagahama M, & Fujii Y (1983) Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the cardiovascular system of rats. *Infect. Immun.* 42(3):1183-1186.
 44. Sakurai J, Fujii Y, Dezaki K, & Endo K (1984) Effect of *Clostridium perfringens* beta toxin on blood pressure of rats. *Microbiol. Immunol.* 28(1):23-31.
 45. Sakurai J & Nagahama M (2003) Mechanism of action of *Clostridium*

- perfringens* beta-toxin. *Recent Res Devel Infect Immun* 1:433-449.
46. Nagahama M, Morimitsu S, Kihara A, Akita M, Setsu K, & Sakurai J (2003) Involvement of tachykinin receptors in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation. *Br. J. Pharmacol.* 138(1):23-30.
 47. Nagahama M, Kihara A, Kintoh H, Oda M, & Sakurai J (2008) Involvement of tumour necrosis factor-alpha in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation in mice. *Br. J. Pharmacol.* 153(6):1296-1302.
 48. Miclard J, Jaggi M, Sutter E, Wyder M, Grabscheid B, & Posthaus H (2009) *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Vet. Microbiol.* 137(3-4):320-325.
 49. Miclard J, van Baarlen J, Wyder M, Grabscheid B, & Posthaus H (2009) *Clostridium perfringens* beta-toxin binding to vascular endothelial cells in a human case of enteritis necroticans. *J. Med. Microbiol.* 58(Pt 6):826-828.
 50. Gurtner C, Popescu F, Wyder M, Sutter E, Zeeh F, Frey J, von Schubert C, & Posthaus H (2010) Rapid cytopathic effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on porcine endothelial cells. *Infect. Immun.* 78(7):2966-2973.
 51. Popescu F, Wyder M, Gurtner C, Frey J, Cooke RA, Greenhill AR, & Posthaus H (2011) Susceptibility of primary human endothelial cells to *C. perfringens* beta-toxin suggesting similar pathogenesis in human and porcine necrotizing enteritis. *Vet. Microbiol.* 153(1-2):173-177.
 52. Autheman D, Wyder M, Popoff M, D'Herde K, Christen S, & Posthaus H (2013) *Clostridium perfringens* beta-toxin induces necrostatin-inhibitable, calpain-dependent necrosis in primary porcine endothelial cells. *PLoS One* 8(5):e64644.
 53. Vidal JE, Ohtani K, Shimizu T, & McClane BA (2009) Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cell. Microbiol.*

- 11(9):1306-1328.
54. Roos S, Wyder M, Candi A, Regenscheit N, Nathues C, van Immerseel F, & Posthaus H (2015) Binding studies on isolated porcine small intestinal mucosa and in vitro toxicity studies reveal lack of effect of *C. perfringens* beta-toxin on the porcine intestinal epithelium. *Toxins (Basel)* 7(4):1235-1252.
 55. Steinhorsdottir V, Halldorsson H, & Andresson OS (2000) *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microb. Pathog.* 28(1):45-50.
 56. Shatursky O, Bayles R, Rogers M, Jost BH, Songer JG, & Tweten RK (2000) *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infect. Immun.* 68(10):5546-5551.
 57. Nagahama M, Hayashi S, Morimitsu S, & Sakurai J (2003) Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. *J. Biol. Chem.* 278(38):36934-36941.
 58. Wilke GA & Bubeck Wardenburg J (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(30):13473-13478.
 59. Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, Wang Y, & Bubeck Wardenburg J (2011) A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat. Med.* 17(10):1310-1314.
 60. von Hoven G, Rivas AJ, Neukirch C, Klein S, Hamm C, Qin Q, Meyenburg M, Fuser S, Saftig P, Hellmann N, Postina R, & Husmann M (2016) Dissecting the role of ADAM10 as a mediator of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin action. *Biochem. J.* 473(13):1929-1940.
 61. Skals M, Leipziger J, & Praetorius HA (2011) Haemolysis induced by

- alpha-toxin from *Staphylococcus aureus* requires P2X receptor activation. *Pflugers Arch.* 462(5):669-679.
62. Cesaro A, Brest P, Hofman V, Hebuterne X, Wildman S, Ferrua B, Marchetti S, Doglio A, Vouret-Craviari V, Galland F, Naquet P, Mograbi B, Unwin R, & Hofman P (2010) Amplification loop of the inflammatory process is induced by P2X7R activation in intestinal epithelial cells in response to neutrophil transepithelial migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299(1):G32-42.
63. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, & Kiyono H (2012) Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 3:1034.
64. Skals M, Jorgensen NR, Leipziger J, & Praetorius HA (2009) Alpha-hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(10):4030-4035.
65. Peng W, Cotrina ML, Han X, Yu H, Bekar L, Blum L, Takano T, Tian GF, Goldman SA, & Nedergaard M (2009) Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(30):12489-12493.
66. Lemaire I, Falzoni S, Zhang B, Pellegatti P, & Di Virgilio F (2011) The P2X7 receptor and Pannexin-1 are both required for the promotion of multinucleated macrophages by the inflammatory cytokine GM-CSF. *J. Immunol.* 187(7):3878-3887.
67. Burnstock G & Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240:31-304.
68. Gudipaty L, Munetz J, Verhoef PA, & Dubyak GR (2003) Essential role for Ca²⁺ in regulation of IL-1beta secretion by P2X7 nucleotide receptor in

- monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285(2):C286-299.
69. Munksgaard PS, Vorup-Jensen T, Reinholdt J, Soderstrom CM, Poulsen K, Leipziger J, Praetorius HA, & Skals M (2012) Leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* causes shrinkage and P2X receptor-dependent lysis of human erythrocytes. *Cell. Microbiol.* 14(12):1904-1920.
70. Vijayvargia R, Suresh CG, & Krishnasastry MV (2004) Functional form of Caveolin-1 is necessary for the assembly of alpha-hemolysin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(3):1130-1136.
71. Nishiyama A, Kaneko J, Harata M, & Kamio Y (2006) Assembly of *Staphylococcal* leukocidin into a pore-forming oligomer on detergent-resistant membrane microdomains, lipid rafts, in human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(6):1300-1307.
72. Seike S, Miyamoto K, Kobayashi K, Takehara M, & Nagahama M (2016) *Clostridium perfringens* Delta-Toxin Induces Rapid Cell Necrosis. *PLoS One* 11(1):e0147957.
73. Miyata S, Minami J, Tamai E, Matsushita O, Shimamoto S, & Okabe A (2002) *Clostridium perfringens* epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 277(42):39463-39468.
74. Ben Yebdri F, Kukulski F, Tremblay A, & Sevigny J (2009) Concomitant activation of P2Y(2) and P2Y(6) receptors on monocytes is required for TLR1/2-induced neutrophil migration by regulating IL-8 secretion. *Eur. J. Immunol.* 39(10):2885-2894.
75. Dubyak GR (2012) P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell. Microbiol.* 14(11):1697-1706.

76. Brennaman LH, Moss ML, & Maness PF (2014) EphrinA/EphA-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule regulates growth cone repulsion through ADAM10 metalloprotease. *J. Neurochem.* 128(2):267-279.
77. Valeva A, Hellmann N, Walev I, Strand D, Plate M, Boukhallouk F, Brack A, Hanada K, Decker H, & Bhakdi S (2006) Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J. Biol. Chem.* 281(36):26014-26021.
78. Nagahama M, Shibutani M, Seike S, Yonezaki M, Takagishi T, Oda M, Kobayashi K, & Sakurai J (2013) The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Infect. Immun.* 81(10):3703-3708.
79. Miller CM, Boulter NR, Fuller SJ, Zakrzewski AM, Lees MP, Saunders BM, Wiley JS, & Smith NC (2011) The role of the P2X(7) receptor in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 7(11):e1002212.
80. Roberts JA, Lukewich MK, Sharkey KA, Furness JB, Mawe GM, & Lomax AE (2012) The roles of purinergic signaling during gastrointestinal inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12(6):659-666.
81. Pelegrin P & Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25(21):5071-5082.
82. Poornima V, Madhupriya M, Kootar S, Sujatha G, Kumar A, & Bera AK (2012) P2X7 receptor-pannexin 1 hemichannel association: effect of extracellular calcium on membrane permeabilization. *J. Mol. Neurosci.* 46(3):585-594.
83. MacVicar BA & Thompson RJ (2010) Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci.* 33(2):93-102.
84. Penuela S, Gehi R, & Laird DW (2013) The biochemistry and function of

- pannexin channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1828(1):15-22.
85. Dubyak GR (2009) Both sides now: multiple interactions of ATP with pannexin-1 hemichannels. Focus on "A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296(2):C235-241.
 86. Baroja-Mazo A, Barbera-Cremades M, & Pelegrin P (2013) The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1828(1):79-93.
 87. Skals M, Bjaelde RG, Reinholdt J, Poulsen K, Vad BS, Otzen DE, Leipziger J, & Praetorius HA (2014) Bacterial RTX toxins allow acute ATP release from human erythrocytes directly through the toxin pore. *J. Biol. Chem.* 289(27):19098-19109.
 88. Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota SA, Gui X, Roberts JA, MacDonald JA, Muruve DA, McKay DM, Beck PL, Mawe GM, Thompson RJ, & Sharkey KA (2012) Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat. Med.* 18(4):600-604.
 89. Diezmos EF, Sandow SL, Markus I, Shevy Perera D, Lubowski DZ, King DW, Bertrand PP, & Liu L (2013) Expression and localization of pannexin-1 hemichannels in human colon in health and disease. *Neurogastroenterol. Motil.* 25(6):e395-405.
 90. Montalbetti N, Leal Denis MF, Pignataro OP, Kobatake E, Lazarowski ER, & Schwarzbaum PJ (2011) Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 286(44):38397-38407.
 91. Boyce AK, Kim MS, Wicki-Stordeur LE, & Swayne LA (2015) ATP stimulates pannexin 1 internalization to endosomal compartments. *Biochem. J.* 470(3):319-330.
 92. Manohar M, Hirsh MI, Chen Y, Woehrle T, Karande AA, & Junger WG (2012) ATP release and autocrine signaling through P2X4 receptors

- regulate gammadelta T cell activation. *J. Leukoc. Biol.* 92(4):787-794.
93. Costa-Junior HM, Marques-da-Silva C, Vieira FS, Moncao-Ribeiro LC, & Coutinho-Silva R (2011) Lipid metabolism modulation by the P2X7 receptor in the immune system and during the course of infection: new insights into the old view. *Purinergic Signal* 7(4):381-392.
 94. Yamashita D, Sugawara T, Takeshita M, Kaneko J, Kamio Y, Tanaka I, Tanaka Y, & Yao M (2014) Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of *Staphylococcal* pore-forming toxins. *Nat Commun* 5:4897.
 95. Menestrina G (1986) Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations. *J. Membr. Biol.* 90(2):177-190.
 96. Eiffler I, Behnke J, Ziesemer S, Muller C, & Hildebrandt JP (2016) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-mediated cation entry depolarizes membrane potential and activates p38 MAP kinase in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 311(3):L676-685.
 97. Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbeil J, van der Goot FG, & Aroian RV (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(30):10995-11000.
 98. Husmann M, Dersch K, Bobkiewicz W, Beckmann E, Veerachato G, & Bhakdi S (2006) Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *S. aureus* alpha-toxin or streptolysin O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344(4):1128-1134.
 99. Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, Bender MH, Nelson AL, & Weiser JN (2006) Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* 281(18):12994-12998.
 100. Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhallouk F, Bobkiewicz W, Cibis I, Bhakdi S, & Husmann M (2009) Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

- 385(4):503-506.
101. Porta H, Cancino-Rodezno A, Soberon M, & Bravo A (2011) Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins. *Peptides* 32(3):601-606.
 102. Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, Park JM, Alexopoulou L, Liu GY, Nizet V, & Lawrence T (2012) The pore-forming toxin beta hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLoS Pathog.* 8(7):e1002812.
 103. Imre G, Heering J, Takeda AN, Husmann M, Thiede B, zu Heringdorf DM, Green DR, van der Goot FG, Sinha B, Dotsch V, & Rajalingam K (2012) Caspase-2 is an initiator caspase responsible for pore-forming toxin-mediated apoptosis. *EMBO J.* 31(11):2615-2628.
 104. Gonzalez MR, Bischofberger M, Freche B, Ho S, Parton RG, & van der Goot FG (2011) Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell. Microbiol.* 13(7):1026-1043.
 105. Dong C, Davis RJ, & Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20:55-72.
 106. Beigi RD, Kertesy SB, Aquilina G, & Dubyak GR (2003) Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 140(3):507-519.
 107. Mansoor SE, Lu W, Oosterheert W, Shekhar M, Tajkhorshid E, & Gouaux E (2016) X-ray structures define human P2X3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* 538(7623):66-71.
 108. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, & Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460(7255):592-598.
 109. Hattori M & Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion

- channel activation in P2X receptors. *Nature* 485(7397):207-212.
110. Karasawa A & Kawate T (2016) Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife* 5.
 111. North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82(4):1013-1067.
 112. Adamson SE & Leitinger N (2014) The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. *FEBS Lett.* 588(8):1416-1422.
 113. Baaske R, Richter M, Möller N, Ziesemer S, Eiffler I, Müller C, & Hildebrandt JP (2016) ATP Release from Human Airway Epithelial Cells Exposed to *Staphylococcus aureus* Alpha-Toxin. *Toxins (Basel)* 8(12): 365.
 114. Fagerberg SK, Jakobsen MR, Skals M, & Praetorius HA (2016) Inhibition of P2X Receptors Protects Human Monocytes against Damage by Leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and α -Hemolysin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 84(11):3114-3130.
 115. Seref-Ferlenguez Z, Maung S, Schaffler MB, Spray DC, Suadicani SO, & Thi MM (2016) P2X7R-Panx1 Complex Impairs Bone Mechanosignaling under High Glucose Levels Associated with Type-1 Diabetes. *PLoS ONE* 11(5): e0155107.

発表論文

1. Nagahama M., **Seike S.**, Shirai H., Takagishi T., Kobayashi K., Takehara M., Sakurai J. Role of P2X₇ receptor in *Clostridium perfringens* beta-toxin-mediated cellular injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 2159-2167 (2015)
2. **Seike S.**, Takehara M., Kobayashi K., Nagahama M. Role of pannexin1 in *Clostridium perfringens* beta-toxin-caused cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 3150-3156 (2016)
3. Nagahama M., Shibutani M., **Seike S.**, Yonezaki M., Takagishi T., Oda M., Kobayashi K., Sakurai J. The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Infect. Immun.* 81, 3703-3708 (2013)

謝辞

本論文に関し、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜りました本学微生物学教室、永浜政博教授に深謝致します。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、微生物学教室の先輩、同輩、後輩に感謝致します。学部時代、ご指導いただきました櫻井純名誉教授、京都薬科大学微生物感染制御学分野、小田真隆教授に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、公益社団法人日本薬学会の事業である日本薬学会長井記念薬学研究奨励金 (Nagai Memorial Research Scholarship from the Pharmaceutical Society of Japan) を頂きました。ここに感謝申し上げます。

大学生活・大学院生活を送るにあたり、著者を遠方から温かく見守り、応援してくれました両親と兄と弟に感謝致します。最後に、著者を全面的にサポートしてくれました妻と笑顔で励ましてくれました娘に心より感謝申し上げます。

以上、この場を借りて御礼申し上げます。

2017年 早春