

○向本雅郁¹、Hang'ombe B Mudenda¹、幸田知子¹、居原秀²、杉本央³、小崎俊司¹

¹大阪府大・院・農学生命、²大阪府大・総合科学、³大阪大・院・医・感染因子

ガス壊疽菌群に属する *Clostridium septicum* の主要な病原因子である α 毒素は、細胞膜上にporeを形成することで細胞に障害を与える細胞溶解毒素である。 α 毒素は細胞膜上のGPIアンカー蛋白を受容体としていることは明らかとなっているが、pore形成毒素としての作用機構の詳細な解明には至っていない。今回、 α 毒素の細胞障害機構解明の一端として、細胞への結合からpore形成に至る細胞膜上での α 毒素の動態を分子レベルで解析した。

α 毒素とL929細胞を反応後、Triton X-114処理、ショ糖密度勾配遠心により、ラフト分画を調製した。ラフト分画中にオリゴマー形成毒素が、さらに、ラフト以外の分画にモノマー毒素の存在が確認された。コレステロールを除去しラフトを破壊するMethyl- β -cyclodextrin(MCD)で細胞を処理後、毒素を反応させた時、ラフト分画に存在していたオリゴマーのバンドが完全に消失し、ラフト以外の分画に存在するモノマー分子の増加が認められた。MCD処理した細胞に毒素を作用させるとMCD未処理細胞と比較して有意に致死活性の減少が見られた。

毒素のコレステロールへの結合を直接阻害するナスタチンで細胞を処理した後、細胞を毒素と反応させたところ、ナスタチン処理によるオリゴマー形成量の減少はほとんど見られなかった。これらの結果より、 α 毒素は細胞膜上の受容体と結合した後、ラフトに集積しオリゴマーを形成することが明らかとなった。細胞膜上のコレステロールは、毒素と細胞との結合には直接関与せず、毒素がオリゴマー形成のためにラフトへ移行することを助ける働きがあることが示唆された。

α 毒素はマウス赤血球においてGPIアンカー蛋白以外の分子量約43kDaの分子(p43)とも結合した。この分子のアミノ酸配列を一部解析したところ、アクチン蛋白の一つであることがデータベースより明らかになった。大腸菌で発現させたp43分子が α 毒素と結合することをtoxin overlay assayで確認した。p43は α 毒素オリゴマーがporeを形成したときに裏打ち蛋白としてporeの安定化に関与している可能性があることから、他の感受性細胞における発現および細胞レベルでの毒素との結合機構について、現在詳しく検討を行っている。