

<S-1> ウエルシュ菌β毒素によるHL-60細胞のカルシニューリン活性化

○金藤博亮、小島高志、小林敬子、永浜政博、櫻井純

(徳島文理大学 薬学部 微生物学教室)

C型ウエルシュ菌β毒素は、分子量約35,000のタンパク毒素で、本菌による壊疽性腸炎の原因毒素である。我々は、β毒素をヒト急性前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞に作用させると、毒素は、細胞膜のラフト上で機能的オリゴマーを形成して種々のイオンの流入、サイトカインの遊離、そして、膨化を引き起こすと報告してきた。今回、本毒素の細胞毒性とサイトカインの遊離の機構について検討した。

β毒素による細胞毒性機構の手がかりを得るため、ホスホオリパーゼC(PLC)阻害剤であるU73122前処理HL-60細胞にβ毒素を作用させた。その結果、この阻害剤によって、本毒素による膨化活性は著しくは阻害されることが判明した。そこで、毒素処理後の細胞のPLC活性の変化をジアシルグリセロール(DG)産生量で検討すると、30秒で最大となること、そして、この増加は、U73122処理で阻害されることから、本毒素は、内因性PLCを活性化して、これらの出来事を発現すると考えられる。次に、PLC活性後のシグナル伝達を明らかにするため、種々の阻害剤で細胞を処理した結果、小胞体からのCa<sup>2+</sup>遊離を抑制するTMB-8、細胞内のCa<sup>2+</sup>キレート剤であるBAPTA-AM、及び、カルモジュリン(CaM)阻害剤であるW-7やTrifluoperazineは、本毒素の膨化を阻害した。さらに、CaMの下流に存在するカルシニューリン(CN)の阻害剤であるシクロスポリンで予め細胞を処理すると、毒素の膨化活性は阻害された。そこで、毒素処理細胞のCN活性を測定すると、毒素量と時間に依存した活性の上昇が認められた。このCN活性は、U73122処理により阻害された。また、CNは、活性化されるとNF-ATと結合し核に移行することが知られているので、毒素処理細胞を共焦点顕微鏡で分析すると、CNが核に移行する像が観察された。以上から、β毒素は、内因性PLCの活性化によりイノシトール-1,4,5-三リン酸を産生し、小胞体からCa<sup>2+</sup>を遊離させCaMを活性化後、CNの関与する一連のシグナル伝達を介して細胞毒性を示すと推察される。