

Title	Vibrio parahaemolyticus Thermostable Direct Hemolysin Can Induce an Apoptotic Cell Death in Rat-1 Cells from Inside and Outside of the Cells
Author(s)	Rochman, Naim
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42608
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ろふまん、 Rochman, ないむ Naim
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16053 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Thermostable Direct Hemolysin Can Induce an Apoptotic Cell Death in Rat-1 Cells from Inside and Outside of the Cells (腸炎ビブリオの産生する耐熱性溶血毒は培養細胞 Rat-1 において細胞外及び細胞内の両側からアポトーシスを引き起こす)
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 品川日出夫 教授 堀井 俊宏

論文内容の要旨

【目的】

腸炎ビブリオは海産物の摂食によって、消化器症状を主体とした食中毒を引き起こす病原細菌である。その主要病原因子は耐熱性溶血毒 (TDH) であり、多くの培養細胞に対して細胞毒性を発揮する。本研究では TDH の細胞毒性発現機構について、TDH 高感受性である培養ラット胎児線維芽細胞 (Rat-1) を用いて解析を行った。

【方法ならびに成績】

TDH は、これまでコロイド様浸透圧性の溶血を起こすとされており、ポリエチレングリコール (PEG4000) (15mM) や、デキストラン (10mM) などによってその赤血球溶血は阻害される。そこでまず、Rat-1 細胞に対しても同様のコロイド様浸透圧性阻害効果がみられるかについて検討した。その結果、グルコース、ラフィノース、PEG、デキストランは、TDH の Rat-1 細胞に対する細胞毒性を阻害できなかった。TDH を作用させた細胞は形態的にはギムザ染色において、核および細胞質体積の減少が認められた。

次に、TDH の細胞毒性に対して種々の細胞内輸送経路遮断薬の効果を検討した。フィリピン (sterol 結合によりカベオラの構築と機能を阻害)、クロールプロマジン (レセプターリサイクリング阻害剤)、クロロキンおよび塩酸アンモニウム (リソソーム阻害剤)、ノドダゾール (マイクロチューブル形成阻害剤)、メネンシン (イオノフォア)、プレフェルディン A (trans-Golgi ネットワーク阻害剤)、カルフォスタチン C およびスタウロスポリン (PKC 阻害剤) は、いずれも TDH の Rat-1 細胞に対する毒性を阻害しなかった。一方モノダンシルカダベリン (MDC、細胞内への物質取り込みに重要な役割を演ずるトランスグルタミナーゼ阻害剤) は、容量依存的に TDH の Rat-1 細胞毒性作用を阻害した (100 μ M で最大の阻害効果)。しかしながら、TDH による赤血球溶血は MDC で阻害されなかった。

さらに、抗 TDH モノクローナル抗体を用いた蛍光染色の共焦点レーザー顕微鏡観察では、TDH を作用させた Rat-1 細胞では、細胞膜よりも細胞質内に TDH の局在を認めた。以上のことは、TDH が従来考えられてきた細胞外からの膜障害性のみならず、細胞内からの毒性発現機構をも有する可能性を示唆した。

そこで、1) TDH のマイクロインジェクション法による直接細胞内注入と、2) *tdh* 遺伝子を挿入した哺乳類細胞発現ベクター (pRSV $_{tdh}$) を用いた細胞内での TDH の毒性発現機構について検討した。その結果、TDH のマイクロインジェクションを行なった細胞は、コントロールとしてデキストラン FITC を注入した場合と異なり、細胞外

から TDH を作用した場合と同様の細胞障害性を示した。また、pRSV*tdh* 遺伝子を導入した Rat-1 細胞では、導入21時間後から細胞障害性が形態上認められた。

導入された *tdh* 遺伝子産物の細胞内局在を調べるために、TDH と GFP との融合タンパクの哺乳類細胞内発現ベクターを構築した (pGFP*tdh*)。また、コントロールとして溶血活性及び細胞毒性のない TDH 変異体 (R7) を産生する pGFP*r7* も構築した。これらを Rat-1 細胞内で発現させ、その細胞生存率を遺伝子導入後21時間の時点で計測した。その結果、Rat-1 細胞の生存率は $16 \pm 5\%$ (pRSV*tdh*)、 $92 \pm 8\%$ (pORSVI/MCS; mock)、 $18 \pm 4\%$ (pGFP*tdh*)、 $95 \pm 6\%$ (pEGFP-C1; mock)、 $94 \pm 7\%$ (pGFP*r7*) であった。

これら TDH による細胞死がアポトーシスによるものかを検討した。TDH を細胞外から加えた場合 Hoechst 33258 で染色を行なった場合、クロマチンの強い凝集と、染色体 DNA のフラグメント化を認めた。更に、DNA のラダー形成を時間経過とともに観察した結果、TDH 暴露後60分でラダーの形成が確認された。同様の結果は、pRSV*tdh* 発現ベクター導入後の Rat-1 細胞でも認められたが、mock ベクターの導入や、pGFP*r7* の導入後の細胞では、アポトーシスの確認はできなかった。アポトーシスをおこした Rat-1 細胞の割合は、 $89 \pm 4\%$ (pRSV*tdh*)、 $95 \pm 5\%$ (TDH 細胞外添加)、 $3 \pm 2\%$ (pORSVI/MCS)、 $3 \pm 2\%$ (pGFP*r7*) であった。アポトーシスの経路を検討したところ、TDH は Caspase-3 の活性化を行なっている可能性が示唆された。

【総括】

TDH は、これまで細胞外からの膜の障害によって溶血をおこすとされてきた。今回、私は、TDH が、Rat-1 細胞では細胞外のみならず細胞内からも細胞毒性を発揮することを明らかにした。さらに、TDH による Rat-1 細胞の死は Caspase-3 の活性化を伴ったアポトーシス経路を介することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は腸炎ビブリオの産生する主要な病原因子である耐熱性溶血毒 (TDH) の培養細胞への細胞毒性発現機構について解析を行った。

TDH は、これまでコロイド様浸透圧性の溶血を起こすとされており、ポリエチレングリコール (PEG) や、デキストランなどによってその赤血球溶血が阻害されることがわかっている。申請者は Rat-1 細胞で PEG とデキストランの阻害効果を検討したが、これらの物質は、TDH の Rat-1 細胞に対する細胞毒性を阻害できなかった。このことは TDH の Rat-1 細胞に対する細胞毒性はコロイド様浸透圧性の作用ではないことを示す。また、TDH を作用させた細胞は形態的にはギムザ染色において、核および細胞質体積の減少が認められた。次に、TDH の細胞毒性に対して種々の細胞内輸送経路遮断薬の効果を検討した。それらの中で、モノダンシルカダベリン (MDC) だけが、容量依存的に TDH の Rat-1 細胞に対する作用を阻害した。しかしながら、TDH による赤血球溶血は MDC で阻害されなかった。このことは、TDH による Rat-1 細胞に対する細胞障害と、赤血球の溶血機構が異なることを示唆する。TDH を Rat-1 細胞にマイクロインジェクションし、細胞内から TDH を作用させた場合と Rat-1 細胞に TDH の遺伝子を導入発現させた場合の双方共に、同様の細胞傷害性が認められた。これら TDH による細胞死はクロマチンの強い凝集と、染色体 DNA の断片化を伴っていた。このことから TDH は Rat-1 細胞に対してアポトーシスを誘導していることが証明された。TDH は、これまで細胞膜の障害によって溶血などを起こすとされてきた。本研究は、TDH が Rat-1 細胞に対して、細胞外のみならず細胞内からも同様の細胞毒性を発揮することを明らかにした。さらに、TDH による Rat-1 細胞のアポトーシスに至る経路は、Caspase-3 の活性化を伴っていることが明らかになった。

以上の結果は、TDH による病原性発現機構の解明に重要な情報を提供することが期待され、学位に値するものと認める。