● 総説

ウエルシュ菌 α 毒素の作用

櫻井 純 永浜 政博 越智 定幸

徳島文理大学 薬学部 微生物学教室

徳島市山城町西浜傍示 180 〒770

〔受付：8月29日，1994年〕

1. はじめに
2. α 毒素の生物活性
 - 1) 酵素活性
 - 2) 溶血活性
 - 3) 血小板凝集活性
 - 4) 薬理作用
 - 5) 細胞膜破壊作用
3. α 毒素の構造と活性
4. α 毒素の作用機構
 - 1) アラキドン酸カスケードの活性化
 - 2) リン脂質代謝の活性化

1. はじめに

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、比較的嫌気度が低い偏性嫌気性のグラム陽性桿菌で、芽胞を形成するクロストリジウム属の代表的細菌である。本菌は、多くのタンパク毒素を菌体外に産生するが、4種の主要毒素、すなわち、 α 、 β 、 ϵ 、そして、 ι 毒素の産生能によって、抗毒素血清による致死、壊死活性の中和試験、あるいは、抗毒素を用いる ELISA によって、A から E 型の5型に分類されている^{1,2)}。本菌は、元来、土壌細菌で自然界に広く分布しているが、自然界から単離されるのは主に A 型菌である^{1,2)}。A 型菌は、ガス壊疽、食中毒の原因菌としてよく知られているが、ヒトや動物の腸管内に常在する¹⁾。しかしながら、本菌は、腸管の損傷や手術による糞便の漏れなど特別な場合を除いては、内因感染によっ

て健康な個体を侵すことはほとんどない。また、本菌の創傷部汚染による外因感染においても、通常、創傷による局所の壊死、血行不良など本菌の感染に有利な条件が満たされぬかぎり、感染症は成立し難い。ガス壊疽は、典型的な例として、交通事故や戦争等におけるウエルシュ菌感染症をあげることができる。本感染症は、血行が遮断され嫌気的な条件の成立した創傷部に、侵入した本菌芽胞が発芽、そして、栄養型細胞に発育、その後、本菌の増殖に伴って、組織破壊が筋肉や皮下組織へ広がる段階を経て成立する。一般的なガス壊疽の臨床症状は、軽症であれば局所の蜂窩織炎、重症のときには、筋組織の壊死、ガスの貯留、さらに、疼痛、発熱、頻脈、頻呼吸、衰弱等の全身的中毒症を併発し、ショックを起こし死に至る。この感染症に対する起病因子としては、本菌感染実験において抗 α 毒素血清の投与がガス壊疽の発症を

抑制することなどから、本菌の産生する α 毒素が推論されてきた³⁾。 α 毒素は、分子量が約 43,000、N-末端アミノ酸がトリプトファン、C-末端アミノ酸がアスパラギン、等電点 (pI) 5.5 の単純タンパク質である。このタンパク質の特徴としては、酸化に対して比較的安定であるが、表面変性を受けて失活しやすいこと⁴⁾、そして、その熱安定性に関して、ユニークな態度、すなわち、活性は、50℃ 付近まで安定であるが、60℃ 付近で著しく低下し、さらに高温処理の場合、活性の失活度が低い、いわゆる、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の α 毒素⁵⁾、腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒素⁶⁾と同様、アレニウス効果を示すことである。 α 毒素は、致死、壊死、溶血、血小板凝集、平滑筋収縮作用等多彩な生物活性を示すことが特徴である¹⁾。さらに、本毒素は、ナグラー反応と呼ばれる卵黄の懸濁反応を示すが、これは、MacFarlane と Knight⁷⁾により本毒素がホスファチジルコリン (PC) をホスホリルコリンとジアシルグリセロールに分解するホスホリパーゼ C 活性を有

することによると報告され (図 1 A)、酵素活性を有する毒素として最初に同定された細菌毒素である。現在では、本毒素は、ホスホリパーゼ C 活性以外に、スフィンゴミエリナーゼなどの酵素活性も有することが知られている。 α 毒素の種々の毒素活性は、これらの酵素活性によると説明されてきた。最近、毒素の精製法が容易となり、実験条件が工夫されることによって、 α 毒素の溶血作用などの生物活性は、この酵素活性と動物細胞の情報伝達系との関連により惹起されることが示され、また、本毒素の遺伝子、そして、種々の細菌のホスホリパーゼ C 遺伝子のクローニングによって、 α 毒素とこれらの酵素のアミノ酸配列の相同性が明らかにされ、さらに、 α 毒素の諸性状と類似性の高いセレウス菌 (*Bacillus cereus*) ホスホリパーゼ C の構造解析がなされたことなど、 α 毒素の構造と活性など多方面のアプローチが可能となってきた。本稿では、過去に報告された α 毒素の代表的生物活性を考察し、そして、最近の研究を中心に毒素の構造と毒素活性の関係、そして、その作用機構を述べ、 α 毒素を概括したい。

A. ホスホリパーゼ C

B. スフィンゴミエリナーゼ

C. ホスフォジエステラーゼ

図 1 α 毒素の酵素作用

2. α 毒素の生物活性

1) 酵素活性

α 毒素は、リン脂質、あるいは、人工基質のリン酸エステル結合の疎水領域側を、図 1 に示すような位置 (→) で切断する酵素活性を有する。この活性は、PC、リゾホスファチジルコリン等を分解するホスホリパーゼ C^{1,8)} (図 1 A)、スフィンゴミエリンを水解するスフィンゴミエリナーゼ¹⁾ (図 1 B)、そして、*p*-ニトロフェニルホスホリルコリン (PNPPC) を水解するホスフォジエステラーゼ活性⁹⁾ (図 1 C) に分けられている。 α 毒素は、PC をスフィンゴミエリンに対して数倍、PNPPC に対して数十倍の速度で分解することから、この 3 種類の酵素活性は、ホスホリパーゼ C、スフィンゴミエリナーゼ、そして、ホスフォジエステラーゼ活性の順に低くなる。ただし、これら 3 種類の酵素活性は、 α 毒素の異なった作用部位で触媒されるのではなく、同じ部位で起こされる反応で、セレウス菌ホスホリパーゼ C を考慮すると、基本的には、3 種類に分類するよりも、基質特異性が低いと考えるべきかもしれない。

本毒素は、ホスファチジルエタノールアミンに対して基質特異性が非常に低く、このリン脂質のミセルや大腸菌の細胞膜画分中のホスファチジルエタノールアミンを分解せず、卵黄ホスファチジルコリンの共存下で、このリン脂質を水解すると報告されている¹⁰⁾。本毒素のホスホリパーゼCのグリセロリン脂質に対する基質特異性は、一般的に、PC>リゾホスファチジルコリン>ホスファチジルエタノールアミンの順に低くなるが、リン脂質に含まれる脂肪酸が全て飽和の場合、全く分解されず、飽和結合が1個の場合、最もよく分解されるなど、飽和度によって大きく影響される¹¹⁾。 α 毒素は、広いpH域(5.0~10.0)でホスホリパーゼC活性を示し、その至適pHは、卵黄ホスファチジルコリンを基質としたとき、pH 7.0~8.0である。 α 毒素の酵素活性発現には、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、あるいは、 Mg^{2+} など金属イオンの添加が必要である⁸⁾。一方、 α 毒素は、陽イオン界面活性剤を添加すると、 Ca^{2+} 非存在下でもPCを水解することから¹²⁾、作用発現には、必ずしも、 Ca^{2+} を要求するのではなく、ミセルが適度に正電荷を帯びる必要があると推察される。EDTA、O-フェナントロリン等のキレート剤で毒素を処理すると酵素活性が消失する⁸⁾。EDTA処理不活化毒素に Ca^{2+} でなく、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} など金属イオンを添加すると、酵素活性が回復すること⁸⁾、 α 毒素は、生合成において Zn^{2+} を要求すること、さらに、KrugとKent⁴⁵⁾によって、 α 毒素の分子内に2個の Zn^{2+} の存在が明らかにされ、 α 毒素は、亜鉛を含むメタロ酵素であると考えられている。

2) 溶血活性

α 毒素は、赤血球膜を破壊し、ヘモグロビン遊離を引き起こす、いわゆる、溶血活性を有する¹⁾。 α 毒素による溶血は、ヤギ等一部の動物を除くほとんどの赤血球で認められる¹⁾。本毒素に対する赤血球の感受性は、ウシ、マウス赤血球が最も高く、次いで、ウサギ、ヒツジ、そして、ヒトが高く、ウマの場合は、非常に低いと報告されている¹⁾。本毒素は、赤血球と37℃でインキュベーションされても溶血を示さず、この反応液を4℃付近に冷却すると溶血が認められる特異な現象、いわゆる、hot-cold型溶血をヒツジ、そして、ウマ赤血球において示す³⁾。我々は、このhot-cold型溶血をウ

サギ赤血球¹⁴⁾でも明らかにしたが、溶血条件によっては、ほとんどの赤血球で認められると考える。

MacFarlane¹³⁾は、 α 毒素によるヒツジ赤血球の溶血反応に先行して毒素のホスホリパーゼC作用による細胞膜リン脂質の分解が起こることを示し、本毒素による動物種間の溶血反応の感受性の相違は、 α 毒素のホスホリパーゼC活性による赤血球のリン脂質の分解速度で説明できると報告した。

Ikezawa¹⁵⁾は、毒素の酵素活性と溶血活性の関係について、酵素活性で赤血球膜表面の基質が分解され、本毒素の基質リン脂質濃度が赤血球膜内において臨界濃度以下になると溶血が引き起こされると推察し、毒素のホスホリパーゼCの基質特異性と赤血球の構成リン脂質組成が要因であると述べている。同様のhot-cold型溶血反応は、*Clostridium novyi*の γ 毒素¹³⁾、黄色ブドウ球菌の β 毒素¹⁶⁾等リン脂質を分解する毒素で知られており、前述の可能性を支持していると思われる。

次に、OakleyとWarrack¹⁷⁾は、 α 毒素による溶血には、 Ca^{2+} 、あるいは、 Mg^{2+} が要求されると報告した。Ikezawaら¹⁸⁾は、毒素によるヒツジ、及び、ヒト赤血球ゴーストの膜リン脂質の分解を Ca^{2+} 、または、 Mg^{2+} が促進させること、そして、この促進効果は、血球膜中のリン脂質、あるいは、リン脂質ミセルのいずれの場合でも認められることから、これらの金属イオンは、毒素の作用発現に重要であると報告している。さらに、毒素によるヒツジ赤血球の溶血反応に対して Ca^{2+} が必須で、その機構として、 Ca^{2+} と膜のリン脂質が結合した Ca^{2+} -リン脂質複合体に毒素が作用し、リン脂質が分解され溶血が起こると推察した¹⁹⁾。また、MeduskiとHochstein²⁰⁾は、血球膜リン脂質のコリン残基の変化、あるいは、その除去がhot-cold型溶血を引き起こすと推察している。

一方、ColemanとBramley²¹⁾は、ヒト赤血球ゴーストを毒素処理したとき、膜リン脂質の分解に伴う(Ca^{2+} 、 Mg^{2+})-ATPase活性の減少が認められること、そして、赤血球ゴーストのこのATPase活性と膜の脂質環境との間に一定の関係が存在することから、毒素による赤血球膜のリン脂質分解が膜の脂質環境の変化を引き起こすと推察した。

これらのことから、 α 毒素による hot-cold 型溶血現象は、37°C のインキュベーション中に毒素の酵素活性によりリン脂質が分解され、赤血球膜がヘモグロビンの遊離をしない程度に変化し、低温に保持されると、安定な膜構造が維持できなくなり膜破壊へ至ると推察されてきた。

最近、 α 毒素に対する化学修飾、モノクローナル抗体の効果、さらに、変異毒素の活性の挙動に、酵素活性と毒素活性との間の埋めがたいギャップが明らかにされている²²⁾。従って、 α 毒素の酵素活性のみで溶血作用など毒素活性を説明することは困難になってきた。既に報告されてきたように、大量の α 毒素で感受性血球を処理すると、直ちに、溶血現象が認められるが、これは、おそらく、本毒素の酵素活性、あるいは、界面活性剤様作用などによって膜破壊が引き起こされると思われる。一方、少量の α 毒素による温和な条件下でのウサギ赤血球の溶血は、細胞内情報伝達系が密接に関連していることが判明した（後述）。今後、 α 毒素の溶血機構の検討から、酵素活性による細胞情報伝達系の活性化機構の解明が期待される。

3) 血小板凝集活性

α 毒素は、血小板凝集作用を有する¹⁾。Barzaghi ら²³⁾ は、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるアスピリン、または、アピラーゼ（ADP 分解酵素）が毒素のヒト血小板凝集活性を阻害することから、毒素による血小板凝集は、アラキドン酸代謝産物と ADP を介した経路で発現すると報告した。Chap と Douste-Blazy²⁴⁾ は、毒素による細胞溶解に先行した濃染顆粒内容物の分泌が血小板凝集の原因であると報告した。一方、 α 毒素による血小板凝集は、卵黄ホスファチジルコリン²⁵⁾、または、PNPPC²⁶⁾ が阻害すること、そして、血小板をセレウス菌ホスホリパーゼ C と黄色ブドウ球菌スフィンゴミエリナーゼ C で処理すると凝集反応が認められることから^{27, 28)}、本毒素の酵素活性による血小板表面リン脂質の加水分解と凝集活性との関連性が推察された。Mauco ら²⁹⁾ は、 α 毒素で血小板を処理すると凝集反応に平行してホスファチジン酸産生の亢進が認められると報告している。

一方、Navran ら³⁰⁾ は、毒素によるヒト血小板の凝集に ADP の分泌、トロンボキサン B₂ 産生、及び、ホスファチジン酸産生は関係なくホスファ

チジルイノシトール加水分解に依存すると報告している。 α 毒素処理したヒト血小板でホスファチジルイノシトールの加水分解が認められないという報告²⁴⁾、さらに、毒素によるヒト血小板の凝集がアスピリンやアピラーゼで阻害されないという報告²⁶⁾ もあり、これらの研究に使用された標品の純度の問題、さらには、血小板凝集反応は、凝集している血小板から遊離する伝達物質によって連鎖的に他の血小板も凝集が誘導される鋭敏な反応で、本毒素の使用量によっては、細胞破壊による伝達物質の遊離を考え合わせると、本毒素による血小板凝集機構については、改めて検討されるべき問題が多いと考える。

4) 薬理作用

本毒素を動物に静注、あるいは腹腔内投与すると、投与量に依存して死に至ること、さらに、皮内、あるいは、皮下に投与すると、注射部位における組織破壊が認められることから、本毒素は、致死活性と皮膚壊死活性を有することが知られている。Ellner³¹⁾ は、¹⁴C 標識 α 毒素をマウス、及び、ウサギに静脈内投与後、放射活性の生体内分布から、毒素の標的臓器は、肝臓であり、そして、そのミトコンドリア画分に放射活性が集まると報告した。

MacFarlane と Datta³²⁾ は、数種の動物の肝臓のミトコンドリア画分を α 毒素で処理すると、いずれのミトコンドリアのリン脂質も同じ速度で加水分解されること、そして、ミトコンドリアのコハク酸酸化酵素活性が著しく低下、酸性ホスファターゼ活性は、逆に上昇、D-アミノ酸酸化酵素活性は、変化を受けないことを明らかにし、本毒素によってミトコンドリアが破壊されることを示した。Grossman ら³³⁾ も、 α 毒素をウサギの筋肉内に投与し、電子顕微鏡を用いて骨格筋ミトコンドリアの膨潤による内膜の破壊、そして、この形態変化に伴って内膜の酵素である α -グリセロリン酸脱水素酵素とマトリックスの酵素であるピルビン酸-リンゴ酸脱水素酵素の活性がともに著しく低下、さらに、同様の変化が単離されたミトコンドリアを毒素処理しても観察されたことから、毒素作用の細胞内における作用点がミトコンドリアであると結論している。このミトコンドリアの変化は、本毒素の致死活性と何らかの関係があると推察さ

れてきた。

Lodge と Leach³⁴⁾ は、 α 毒素がモルモットの空腸に対するアセチルコリンの収縮作用を減少させること、Knickelbein と Rosenberg³⁵⁾ は、テトロドトキシンが本毒素によるラット筋繊維膜のリン脂質の分解を阻害すること、Philipson ら³⁶⁾ は、 α 毒素をイヌの心臓由来の筋繊維膜小胞に作用させたとき、ジアシルグリセロールの小胞が認められるのに、その膜の透過性は損なわれず、 Ca^{2+} 取り込みが亢進すること、Regal と Shideman³⁷⁾ は、ヒヨコの胚由来の心臓に本毒素を作用させると、アセチルコリン、アンジオテンシン II、4-メチルヒスタミンに対する応答が阻害されるが、これらの薬物共存下で組織を毒素処理すると、その応答の低下が認められないと報告している。これらの結果は、 α 毒素が組織に障害を与えていることを示唆すると考えられる。

Tselukh ら³⁸⁾ は、粗毒素標品をゴールデンハムスターに静注し、その口腔後方囊の粘膜における微小循環系の変化を観察し、毒素投与直後細動脈の変化はないが、その後、細動脈の収縮、あるいは、消失が認められ、次に、血流の停滞、あるいは、停止、さらに、細動脈の弛緩を、また、Sugahara ら³⁹⁾ は、 α 毒素のモルモット皮内投与によって、血管透過性の亢進を報告している。また、Ohsaka ら⁴⁰⁾ は、ラット腸間膜に α 毒素を滴下すると、その初期には細動脈の変化は認められないが、その後、細動脈の血管壁に白血球の付着、そして、血小板凝集塊の形成、さらに、毛細管の血流停滞が生じ、細動脈が凝集塊で閉塞され、その血管領域全体の血流停止が生ずると報告した。

Sakurai ら⁴¹⁾ は、 α 毒素をラットに静注すると、心電図に全く変化を与えず末梢血流抵抗が増大後、血圧上昇が起こること、さらに、リン脂質代謝の活性化による摘出動脈血管の収縮を報告した。これらの報告の中で末梢血流に影響を与える本毒素の作用は、ガス壊疽との関連性が推察され、特に、毒素による血管収縮と密接に関連する代謝系は、他の細菌ホスホリパーゼCによっても明らかにされ注目されている（後述）。このように、 α 毒素により組織破壊されることなく、リン脂質代謝系を介して毒素活性が発現されることは、溶血作用の場合と考え合わせ興味あることである。

5) 細胞膜破壊作用

α 毒素は、血小板、赤血球以外、白血球、肥満細胞、脂肪細胞、種々の培養細胞、そして、細菌のスフェロプラストやプロトプラストに対しても膜の透過性の変化、破壊、また、ミクロゾームやリソゾームも破壊すると報告されている¹⁾。多くの場合、それらの作用と細胞膜のリン脂質分解との関連性が推察されているが、毒素標品の純度、実験条件など検討すべきことも多く、改めて検討する必要があると考える。

3. α 毒素の構造と活性

ウエルシュ菌 α 毒素をコードする遺伝子が染色体上に存在することが明らかにされ⁴²⁾、その遺伝子が単離、解析された^{43, 44)}。一方、動物細胞の内因性ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼCが細胞内におけるセカンドメッセンジャーの生成に重要な働きをしていること、さらに、動物細胞由来のホスホリパーゼCと同様、細菌由来のホスホリパーゼCも動物細胞の情報伝達系を活性化することが明らかにされ、細菌の産生するホスホリパーゼCが注目されることになった²²⁾。最近、セレウス菌、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、そして、ビフェルメンタンス菌 (*Clostridium bifermentans*) のホスホリパーゼCの各遺伝子がクローニングされ、塩基配列が決定された²²⁾。 α 毒素遺伝子の塩基配列、そして、種々の細菌のホスホリパーゼCの遺伝子から推定されるアミノ酸配列を比較すると、 α 毒素のN-末端のトリプトファン (Trp) から247番目のアスパラギンまでのアミノ酸配列とこれらの酵素のアミノ酸配列との間に高い相同性が認められ、本毒素のN-末端から約250残基までがホスホリパーゼC活性に重要であると推察されている²²⁾。さらに、 α 毒素とセレウス菌ホスホリパーゼCは、PCを分解すること、また、両者のタンパク質は、通常の方法で亜鉛を測定すると、分子あたり少なくとも2個と算定されること^{45, 46)}、さらに、キレート剤処理後は、亜鉛など2価の金属イオンを添加しないと活性発現しないこと⁹⁾ など、両者の間に類似点が多く認められる。一方、セレウス菌ホスホリパーゼCは、X線解析によって、その3次元構造が明らかにされた⁴⁷⁾。また、*Penicillium*

citrinum スクレアーゼ P1 は、分子量が約 44,000 のタンパク質で、亜鉛要求性、アミノ酸配列、さらに、RNA、DNA に作用して 5' スクレオチドを遊離させるホスフォジエステラーゼ活性を有するなど諸性質がセレウス菌ホスフォリパーゼ C と類似している酵素で、しかも、3 次元構造が解析されている⁴⁸⁾。そこで、これら 2 種類の酵素のアミノ酸配列、そして、亜鉛のリガンドとしてのアミノ酸を参考に、遺伝子操作を用いて、 α 毒素の特定のアミノ酸残基の役割を検討した我々の研究を中心にして⁴⁹⁾、 α 毒素の構造と機能について、以下

に考察する。

Hough ら⁴⁷⁾ は、セレウス菌ホスフォリパーゼ C を $\sim 10 \mu\text{M}$ Zn^{2+} 溶液中で結晶化後、X 線解析し、この酵素中には、3 個の亜鉛が存在すること、さらに、図 2 に示すように、それらの亜鉛の中の一つの亜鉛は、1 位の Trp, 14 位のヒスチジン (His), 122 位のアスパラギン酸 (Asp) によってリガンドされていること、2 番目の亜鉛は、128 位と 142 位の His, そして、146 位のグルタミン酸 (Glu) でリガンドされていること、3 番目の亜鉛は、69 位と 118 位の His, 55 位と 122 位の Asp でリガンドされていると報告している。また、*P. citrinum* のスクレアーゼ P1 は、X 線解析され、下記のようにセレウス菌ホスフォリパーゼ C の場合と非常に類似した結果が報告されている⁴⁸⁾ (図 2)。すなわち、スクレアーゼ P1 は、3 個の亜鉛を有し、一つの亜鉛は、1 位の Trp, 6 位の His, 120 位の Asp でリガンドされていること、2 番目の亜鉛は、126 位と 149 位の His, そして、153 位の Glu でリガンドされていること、3 番目の亜鉛は、60 位と 116 位の His, 45 位と 120 位の Asp でリガンドされていること、さらに、特徴的なこととして、この 120 位の Asp は、セレウス菌ホスフォリパーゼ C の 122 位の Asp の場合と同様、1 番と 3 番の亜鉛にブリッジをかけていることである⁴⁸⁾。しかも、この二つの酵素内における 3 個の亜鉛の互いの位置関係は、非常に類似している。これらの結果から、諸性質はもとより、この 2 種類の酵素の 3 次元構造は、極めて類似しているタンパク質ということになる。そこで、セレウス菌ホスフォリパーゼ C、そして、スクレアーゼ P1 において、亜鉛のリガンドとして働くアミノ酸を基準とし、 α 毒素とビフェルメントランス菌ホスフォリパーゼ C のアミノ酸配列のホモロジーを考慮し²²⁾、 α 毒素と 3 種類の酵素のアミノ酸配列を比較すると、図 3 に示すようになる。セレウス菌ホスフォリパーゼ C、そして、スクレアーゼ P1 の亜鉛のリガンドとして働くアミノ酸は、全く同一で、その配列は、大変類似していることから、3 個の亜鉛をリガンドするモチーフとして、 $\text{Trp-X}_{\text{L1}}\text{-His-X}_{\text{L2}}\text{-Asp-X}_{\text{L3}}\text{-His-X}_{\text{L4}}\text{-His-X}_{\text{L4}}\text{-His-X}_{\text{L6}}\text{-Asp-X}_{\text{L7}}\text{-His-X}_{\text{L4}}\text{-Glu}$ (L1,2,3,4,そして、7 は、図 3 参照) の配列が考えられる。さらに、これらのアミノ酸配列の比較から、図に

*上記の数字の単位は、Å である (亜鉛間の距離)。

図 2 セレウス菌ホスフォリパーゼ C と *P. citrinum* スクレアーゼ P1 における亜鉛とアミノ酸の関係

アミノ酸スペース (アミノ酸の個数)

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
α 毒素	9	44	11	57	3	5	11	3
B-PLC	12	40	13	48	3	5	13	3
CB-PLC	9	44	11	57	3	5	11	3
PC-NC	5	38	14	55	3	5	12	3

α 毒素：ウエルシュ菌 α 毒素 B-PLC：セレウス菌ホスフォリパーゼC
CB-PLC：C. bifermentansホスフォリパーゼC PC-NC：P. citrinumヌクレアーゼP1

図3 α 毒素、ホスフォリパーゼC、そして、P. citrinum ヌクレアーゼP1のアミノ酸配列

示すように、ウエルシュ菌 α 毒素、ビフェルメンタンス菌の酵素もこのモチーフを持っている。そこで、ウエルシュ菌 α 毒素は、本毒素分子内には3個の亜鉛が存在し、この3個の亜鉛は、このモチーフによって分子内に保持されていると推察される。

ウエルシュ菌 α 毒素は、分子内に9個のHis残基を有しているが、それぞれの残基を部位特異的突然変異誘発 (site-directed mutagenesis) によって、グリシン (アラニン、あるいは、ロイシン) に置換したH68G (68位のHis残基をグリシンに置換)、H126G、H136Gの各変異毒素は、溶血、致死、ホスフォリパーゼC、スフィンゴミエリナーゼ、ホスフォジエステラーゼ活性がインタクト毒素の100分の1程度にまで減少し、H148Gは、いずれの活性も完全に消失した。H46G、H207G、H212G、H241Gの場合は、いずれの活性もインタクト α 毒素の活性と相違は認められなかった。一方、これらの変異毒素は、 α 毒素、あるいは、各変異毒素の抗血清に対するゲル内沈降反応、トリプシンによる限定分解において、さらに、イオ

ン交換カラムにおける溶出パターンにおいてもインタクト毒素との間に相違が認められないことから、これらの変異による構造的変化、さらに、タンパク表面の電荷の変化はないか、少ないものと考えられる (グリシン以外アラニン、ロイシンに置換した場合も同様の結果であった)。そこで、68、126、136、148位のHis残基は、本毒素の活性発現に重要な残基と考えられる。この4個のHis残基の配列は、セレウス菌ホスフォリパーゼC、そして、P. citrinum のヌクレアーゼP1における亜鉛のリガンドとして働いている各His残基の配列とよく対応することから⁴⁸⁾、本毒素においても68、126、136、148位のHis残基が亜鉛のリガンドとして働いていると考えられる。また、 α 毒素の46、207、212、241位のHis残基が活性発現に全く関与していないことも考慮すると、さらに、これらの4個のHis残基が α 毒素の活性に重要とクローズアップされ、 α 毒素が亜鉛を保持する機構がセレウス菌ホスフォリパーゼC、そして、P. citrinum ヌクレアーゼP1と大変類似していると推察される。

セレウス菌ホスホリパーゼC、そして、ヌクレアーゼP1において、強固に結合している亜鉛と弱く結合している亜鉛の存在は知られているが、これらの酵素内でのそれぞれの亜鉛の結合力、そして、役割に関しては不明の点が多い。 α 毒素の68, 126, 136, 148位のHis残基と亜鉛との関係は、以下のようなことが明らかとなった。ヒツジ赤血球膜とインタクト α 毒素、あるいは、変異毒素を Ca^{2+} 存在下、または、非存在下でインキュベーションし、赤血球膜への結合を抗 α 毒素抗体を用いるウエスタンブロットで測定すると、インタクト毒素とH148Gは、 Ca^{2+} 存在下で膜に結合するが、H68G, H126G, H136Gは、 Ca^{2+} の存在の有無に関係なく膜への結合が確認されなかった。すなわち、H148Gは、インタクト毒素と同様、膜への結合能を保持しているのに対して、H68G, H126G, H136Gは、その結合能が非常に低いと考えられる。従って、68, 126, 136位のHis残基は、膜への結合に関与している残基であり、148位のHis残基は、活性発現に重要で結合には関与しない残基であることになる。 α 毒素をEDTA処理で可逆的に失活させ、その処理毒素の亜鉛含量を測定すると、分子あたり2個と、未処理毒素の場合と同様の値が得られた。そこで、セレウス菌ホスホリパーゼCと同様、 α 毒素分子内にはキレート剤処理では容易にはずれない強固に結合している2個の亜鉛の存在が明らかになったが、インタクト毒素には2個の亜鉛しか測定できず、キレート剤不活化毒素は、金属イオンの添加で活性が回復するので、亜鉛以外の金属イオンがもう1個存在すると推察される。そして、その金属イオンは、キレート剤で容易にはずれると考えられる。H68G, H126G, H136Gの亜鉛含量を測定すると、いずれも2個であり、H148Gの場合は、1個であった。そこで、毒素中のはずれやすい金属イオンの存在を調べるため、 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ を含む緩衝液中で α 毒素、あるいは、変異毒素をインキュベーションすると、 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ は、68, 126, 136位のHis残基のいずれかが置換された変異毒素には取り込まれず、148位のHis残基が置換された変異毒素には、インタクト毒素と同様、 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ が取り込まれることが判明した。

これらの知見から、68, 126, 136位のHis残基

は、容易にはずれる金属イオンのリガンドであるのに対して、148位のHis残基は、強固に結合している2個の亜鉛の一つをリガンドする官能基であることが強く支持された。さらに、インタクト毒素において取り込まれる $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 量は、2価の金属イオン、例えば、 Co^{2+} , Mn^{2+} などの添加用量に依存して阻止されること、そして、キレート剤処理毒素は、亜鉛以外のこれらの金属イオンの添加でも活性が発現することから、68, 126, 136位のHis残基でリガンドされる金属イオンは、亜鉛に限らず Co^{2+} , Mn^{2+} のような金属イオンでもよいと考えられる。キレート剤処理したインタクト毒素に Ca^{2+} を添加すると、弱い赤血球膜への結合が認められるが、溶血作用は発現しない。このキレート剤処理で不活化された毒素に Co^{2+} , あるいは、 Zn^{2+} などの金属イオンのみを添加しても赤血球への結合も溶血も全く認められないが、 Ca^{2+} 存在下これらの金属イオンを添加すると、毒素の血球膜への結合が著しく増加し、溶血作用が認められることから、毒素が血球膜に結合するとき Ca^{2+} は、必須の因子で、さらに、 Zn^{2+} , Co^{2+} , あるいは、 Mn^{2+} などの金属イオンも結合に重要な働きをしていると考えられる。一方、インタクト毒素のホスホリパーゼC活性発現には、 Ca^{2+} が必ずしも必須でなく、他の2価の金属イオンでも認められることから、 Ca^{2+} は、酵素活性に重要でなく、毒素が血球膜への結合に必須の金属イオンと考えられる。次に、68, 126, 136位のHis残基の置換は、血球膜に結合できなくなることで、そして、3位のはずれやすい金属イオンを保持できないこと、さらに、この官能基を他のアミノ酸に置換した変異毒素は、 Co^{2+} , Mn^{2+} などの金属イオンを添加すれば赤血球膜に結合して作用を示すことから、これら3つのHis残基が同時に存在しないと、金属イオンの保持力が著しく減少していると考えられる。一方、これらの変異毒素は、酵素活性も溶血作用同様、著しく減少していることから、この金属イオンは、基質への結合に重要であると思われる。148位のHis残基が置換された変異毒素は、溶血活性だけでなく酵素活性も完全に消失していることから、強固に結合している1個の亜鉛が作用部位（リン酸エステル結合切断）において重要な役割を演じていると考えられる。

本毒素の136位のHis残基は、セレウス菌ホスフォリパーゼCのX線解析から判断すると、148位のHis残基がリガンドしている亜鉛と結合している可能性が推察される。しかしながら、136位のHis残基は、前述したように、68, 126位の残基と全く同じ挙動を示すので、はずれやすい金属イオンと相互作用すると考えられ、この残基のみは、セレウス菌ホスフォリパーゼCのX線解析と遺伝子操作による α 毒素のアミノ酸置換の実験結果が一致しないことが判明した。この矛盾点を説明することはできないが、 α 毒素は、セレウス菌ホスフォリパーゼCにアミノ酸が120残基程度C-末端領域に付加されたタンパク質であるので²²⁾、136位のHis残基の存在する領域の3次元的な構造変化が引き起こされていることも推察される。

α 毒素の11位のHis残基を他のアミノ酸に置換した変異毒素の遺伝子を大腸菌にトランスフォームし、培養すると、菌体内にも培養上清にも、変異毒素は、検出されず、他のHis置換変異毒素が、全て発現したのに対して、この変異毒素のみが異なった結果を示す。セレウス菌ホスフォリパーゼCのX線解析によると、この酵素は、N-末端に存在するTrp残基と14位のHis残基が亜鉛とリガンドし、N-末端領域は、タンパク質の内部に埋め込まれていると考えられ、この亜鉛は、このタンパク質の構造維持に働いていると推察されている⁴⁷⁾。一方、 α 毒素、また、EDTA処理毒素をアミノペプチダーゼ処理しても、いかなるアミノ酸の遊離も観察されず、当然、毒素活性へのいかなる影響もない。これに対して、 α 毒素をカルボキシペプチダーゼ処理し、C-末端アミノ酸が15個程度切除されると毒素活性が有意に減少すること、さらに、C-末端側20個削除された変異毒素も同様に活性が減少した⁴⁹⁾。これらのことから、 α 毒素のC-末端領域は露出しているのに対して、毒素のN-末端領域は、セレウス菌ホスフォリパーゼCと同様、分子内部に埋め込まれてアミノペプチダーゼの作用を受けないと推察される⁵⁰⁾。そこで、11位のHis残基が置換され、亜鉛とリガンド形成ができなくなると、毒素分子内部にN-末端領域が埋め込まれず、毒素の構造にひずみが生じ、大腸菌の菌体内のタンパク分解酵素の攻撃を受け発現しないものと推察される。言い換えると、 α 毒素において、

この1番の亜鉛[Zn(1)]と1位のTrp残基、11位のHis残基とのリガンド形成は、毒素の構造維持に重要と考えられる。

Titballら⁵¹⁾は、 α 毒素のC-末端領域120個のアミノ酸残基を削除してもホスフォリパーゼC活性を示すことから、ホスフォリパーゼC活性に重要でなく、その酵素活性にはN-末端領域約250残基が必要であると報告している。我々の結果では、C-末端領域から15個前後のアミノ酸を削除するとホスフォリパーゼC活性も、他の毒素活性も減少した⁴⁹⁾。一方、Titballらが研究対象としたC-末端120個アミノ酸削除変異毒素は、そのC-末端にペクター由来のアミノ酸7個からなるペプチドを有しているので⁵¹⁾、そのペプチドが毒素の安定化などに働いていることも考えられる。さらに、 α 毒素のC-末端領域を持たないセレウス菌ホスフォリパーゼCは、酵素活性のみを有していることから、 α 毒素のN-末端領域にホスフォリパーゼC活性が存在し、溶血、致死、壊死などの生物活性発

* セレウス菌ホスフォリパーゼC、そして、*P.citrinum* スクレアーゼPIの場合とはほぼ同じ距離と推察される。

Zn: 亜鉛 X: 金属 (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} など)

金属の役割

金属の位置	役割	リガンドとの結合
Zn (1)	構造維持	強い
Zn (2)	作用部位	強い
X (3)	結合部位	弱い

() 内の数字は、金属の位置を表す。

図4 α 毒素の金属イオンとアミノ酸の関係

現には、この酵素活性と C-末端領域との共同作業によると考えるのは論理的である。そこで、毒素の C-末端領域は、毒素表面に露出していることから、作用する細胞と C-末端領域との結合は、大いに考えられ、また、 α 毒素が有する酵素活性と種々の毒素活性が化学修飾剤、 α 毒素のモノクローナル抗体処理で異なる挙動をとることから、毒素活性には、酵素活性とは異なった領域、すなわち、C-末端領域が重要である可能性が高い。ただし、部位特異的突然変異誘発による His 残基の置換の研究で作成された変異毒素において、酵素活性が消失すると、本毒素の全ての毒素活性も消失することから、本毒素の毒素活性の中心は、リン脂質を分解する活性であると思われる。

以上、図 4 に示すように、 α 毒素の金属イオンは、次のように考えられる。 α 毒素は、強固に結合している 2 個の亜鉛と容易に交換され弱く結合をしている金属イオン（亜鉛、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} など）1 個を有する。強固に結合している 2 個の亜鉛の中の 1 位の亜鉛 [Zn (1)] は、11 位の His 残基、そして、おそらく、N-末端の 1 位の Trp 残基、130 位の Asp と結合し、N-末端領域と共に毒素タンパク質の内部に埋め込まれた状態で存在し、毒素の構造維持に、さらに、2 位の亜鉛 [Zn (2)] は、特に、148 位の His 残基と非常に強く結合し、リン酸エステルを切断する過程、すなわち、作用部位において重要な働きをしている。次に、毒素タンパク質と弱い結合で保持されている 3 位の金属イオン (X) は、少なくとも、68, 126, そして、136 位の His 残基でリガンドされており、この金属は、基質、すなわち、リン脂質との結合に重要な役割を演じている。そこで、 α 毒素の C-末端領域の知見を考え合わせると、毒素の作用機構は次のように推察される。 α 毒素が種々の細胞、組織に結合するとき、毒素の C-末端領域の特定の部位が、おそらくは、 Ca^{2+} を介して細胞膜に存在する特定の部位（受容体）と相互作用し、さらに、68, 126, 136 位の His 残基がリガンドする金属イオンを介して膜中のリン脂質と相互作用、いわゆる、受容体とリン脂質の 2 カ所に結合することによって、 α 毒素は生体膜中のリン脂質に特異的に結合し、最終的に、2 位の亜鉛が触媒してリン脂質のリン酸エステルを切断すると推察される。

4. α 毒素の作用機構

ウエルシュ菌の産生する α 毒素は、前述したように種々の生物活性を有する特異な毒素であるが、これらの活性は、毒素のホスホリパーゼ C、あるいは、スフィンゴミエリナーゼ作用による生体膜中のリン脂質の分解に起因する膜破壊と推論されてきた。しかしながら、 α 毒素の種々の生物活性は、人工膜と異なり、生体膜の場合、リン脂質が一部分解されれば膜破壊が引き起こされると言う単純な過程でなく、毒素作用によって誘導される細胞内情報伝達系が複雑に絡み合っていることが明らかになってきた。そこで、 α 毒素によるラット平滑筋収縮とウサギ赤血球溶血機構に関する我々の研究を中心に、他の細菌のホスホリパーゼ C のデータも考慮して、 α 毒素作用とリン脂質代謝系との関連について説明する。

1) アラキドン酸カスケードの活性化

α 毒素をラットに静注すると、心電図の QRST 波に影響を与えることなく、末梢血流量の低下を伴う血圧上昇が観察され⁴¹⁾、従って、毒素によって血流抵抗の増大、すなわち、血管の収縮が推察されるが、事実、ラット摘出大動脈血管組織に本毒素を作用させると、毒素量に依存して収縮が引き起こされる⁵²⁾。 α 毒素が血管組織に作用すると、ホスファチジルイノシトール代謝回転が活性化し、アラキドン酸合成が亢進する。この時、ホスホリパーゼ A_2 の阻害剤であるキナクリンを作作用させてもアラキドン酸合成は全く影響されないことから、アラキドン酸は、ホスファチジルイノシトール代謝回転の活性化によって生じるジアシルグリセロールにジアシルグリセロールリパーゼが作用することによって遊離すると考えられる⁵³⁾。この組織においては、アラキドン酸は、ロイコトリエン合成系に流れることなく、サイクロオキシゲナーゼの作用から始まるアラキドン酸カスケードに代謝され、トロンボキサン A_2 産生へと進行する（図 5）。毒素による収縮作用は、トロンボキサン A_2 合成阻害剤 (OKY-046)、そして、その拮抗剤 (ONO-3708) にて阻害され、さらに、毒素作用によってトロンボキサン A_2 合成量が亢進することから、 α 毒素による収縮は、生成したトロンボキサン A_2 によると考えられる⁵³⁾。一方、トロンボ

図5 α 毒素によるアラキドン酸カスケードの活性化

キサン A₂ は、血管組織に存在しないという報告があり、その合成場所の検討から、その部位は、血管の筋組織でなく、血管内皮細胞であることが明らかとなり、毒素の血管組織に対する作用の構図は、次のように考えられる (図5)。すなわち、静注された α 毒素は、血管内皮細胞に作用して、ホスファチジルイノシトール代謝を亢進、生じたジアシルグリセロールからジアシルグリセロールリパーゼの作用を介してアラキドン酸が生成、そして、アラキドン酸カスケードの活性化からトロンボキサン A₂ の生成が促進され、最終的に、生成したトロンボキサン A₂ が血管筋組織に作用して収縮を引き起こす機構である⁵³⁾。さらに、この一連の初期の過程において、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) が分解され、ジアシルグリセロールとイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) が生成すると考えられるので、ジアシルグリセロールによるプロテインキナーゼ C の活性化、IP₃ による細胞内遊離カルシウム量の増加も、上記の作用発現の過程に密接に関わっていると考えられる (図5)。このように、毒素作用が二重、三重に代謝系に影響を与え、生体内のホメオスター

シスを破壊することが、毒素作用の本態と考える。その後、この血管組織に対する毒素の作用と同様の結果は、その後、他の細菌のホスホリパーゼ C においても報告されている。例えば、セレウス菌ホスホリパーゼ C は、動物細胞においてアラキドン酸カスケードを活性化し、プロスタグランジン合成を亢進すること⁵⁴⁾、そして、緑膿菌ホスホリパーゼ C は、マウスの腹腔細胞のサイクロオキシゲナーゼ、そして、リポオキシゲナーゼ系を活性化し、トロンボキサン A₂、プロスタグランジン、ロイコトリエン合成系を亢進すること⁵⁵⁾である。このように他の細菌の産生するホスホリパーゼ C がアラキドン酸カスケードを活性化することも明らかにされてくると、 α 毒素の血管平滑筋収縮作用に限らず、本毒素による活性の中のいくつかもアラキドン酸カスケードの活性化と密接に関係していることも考えられる。すなわち、ロイコトリエン C₄ と D₄ の血管透過作用、ロイコトリエン C₄ の腸管収縮作用、さらには、トロンボキサン類の血小板凝集作用を考えると、 α 毒素が有するこれらの活性とアラキドン酸代謝物との間に関連性が推察される。次に、ラット摘出腸管に

対する α 毒素の収縮作用は、毒素によるリン脂質代謝の活性化、おそらく、 PIP_2 からジアシルグリセロールと IP_3 の生成を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が引き起こされ、 Ca^{2+} とカルモジュリンが結合、そして、生成する Ca^{2+} -カルモジュリン複合体によるミオシン軽鎖キナーゼの活性化を介して誘発されること⁵⁶⁾、そして、輸精管組織に対しては、毒素処理すると、リン脂質代謝を伴って、ノルエピネフリンに対する収縮感受性が增大すること⁵⁷⁾が報告されている。これら以外の生物活性発現の場合にも、リン脂質代謝の活性化との関連性が報告されている。以上から、 α 毒素が示す毒素活性において、細胞内で最初に引き起こされる共通のステップは、リン脂質の代謝系の亢進であり、その後、その代謝亢進が引き金となり、生じる代謝産物、また、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって、組織、細胞が有するそれぞれ固有の代謝系が活性化され、組織、細胞に特異的な反応が引き起こされ、その結果、 α 毒素の作用が誘導されると推察される。

ウエルシュ菌によるガス壊疽に α 毒素が主な原因毒素として関与していると言う考えは異論のないところであるが、これまで、本感染症に対する毒素の関わりを直接的に説明することは難しい問題であった。前述の α 毒素の作用機構をあてはめると次のように考えられる。ウエルシュ菌感染部位において、本菌が産生する α 毒素によってアラキドン酸カスケードの活性化を介するトロンボキサン A_2 合成亢進が引き起こされ、その結果、血管の収縮による血流障害からの組織への酸素、栄養の供給障害、さらに進むと、トロンボキサン類による血小板凝集亢進も関わって、血流障害による組織壊死へと進行し、最終的に、その壊死組織へのウエルシュ菌の増殖による病巣範囲の拡大が本感染症の実態であると推察される。また、本毒素によって合成促進されたアラキドン酸代謝物は、組織の炎症に関連した物質も多く、この代謝系は、ガス壊疽における種々の症状にも強い関連性を有していることが推察される。

2) リン脂質代謝の活性化

ウサギ赤血球は α 毒素と 0.3mM Ca^{2+} 存在下 37°C でインキュベーションし、その後、 4°C 付近の低温に保持されて、はじめて、溶血が認められ、ヒ

ツジ赤血球の場合と同様、この赤血球においてもhot-cold型溶血が認められる¹⁴⁾。しかしながら、この溶血は、 37°C におけるインキュベーション時間に依存し、 4°C での保持時間には基本的に無関係であった。溶血作用とホスファチジン酸産生との関係を検討すると、次のようになる。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ オルトリン酸とウサギ赤血球のインキュベーションによってラベルされた赤血球を 37°C で毒素処理すると、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ホスファチジン酸産生量は、溶血作用と同様、毒素量、さらには、 37°C でのインキュベーション時間に依存して増加し、さらに、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下赤血球膜を 37°C で毒素処理した場合も、同様にホスファチジン酸の合成が認められた。サポニン処理によるスキンド化赤血球の α 毒素による溶血は、ホスホリパーゼC阻害剤（ネオマイシン）によって用量に依存して阻害されるが、未処理血球の場合、その阻害剤の効果は認められなかった。さらに、ネオマイシンは、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下赤血球膜における毒素による $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ホスファチジン酸産生を阻害した。この結果は¹⁴⁾、毒素による溶血作用とホスファチジン酸産生の間に密接な関係が存在することを示唆している。ネオマイシンは、基質となるリン脂質との相互作用によってホスホリパーゼC阻害作用を示すこと、この阻害剤は、スキンド化赤血球の場合のみ溶血阻止効果を示すこと、そして、 α 毒素は、細胞膜を貫通、あるいは、膜中に侵入しないことから、 α 毒素の基質となるリン脂質がサポニン未処理の場合、血球表面でネオマイシンと相互作用できない状態で存在する可能性も完全には否定できないが、本毒素の溶血と関係があり、ネオマイシンと相互作用すると考えられるリン脂質は、血球膜中、あるいは、その内側に存在し、このリン脂質は、毒素によって活性化された血球膜の内因性ホスホリパーゼCに攻撃されると推察される。

ウサギ赤血球膜を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下毒素処理した時の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ホスファチジン酸産生の経時的变化は、二相性を示す。すなわち、その変化は、図6に示すように、毒素処理直後（30秒前後）に認められるピーク（第1期；first phase）と、その後、しばらくしてから認められるピーク（第2期；second phase）である。さらに、赤血球膜を毒素処理すると、ホスファチジン酸の場合と同様、ジ

	第一期 (First phase; A)	第二期 (Second phase; B)
Max (時間)	15~30秒	10~20分
ホスホリパーゼ	ホスホリパーゼC	ホスホリパーゼD
基質 (血球膜内)	ホスファチジルイノシ トール 4,5-二リン酸	ホスファチジルコリン(?)
ホスファチジン酸 合成経路	ホスファチジルイノシ トール 4,5-二リン酸 ↓ ジアシルグリセロール ↓ イノシトール 1,4,5-三リン酸 ↓ [³² P]ホスファチジン酸	ホスファチジン酸 ↓ ジアシルグリセロール ↓ [³² P]ホスファチジン酸
PMA ^{a)}	阻害	効果無
H-7 ^{b)}	亢進	効果無
プロテインキナーゼC ダウンレギュレーション	亢進	—
プロテインキナーゼC 活性	上昇 (膜内)	—
百日咳毒素	阻害	—

^{a)}ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート; プロテインキナーゼC活性化剤

^{b)}1-(5-イソキノリンスルフォニル)-2-メチルピペラジン; プロテインキナーゼC阻害剤

図6 ウサギ赤血球膜における α 毒素のホスファチジン酸合成亢進効果

アシルグリセロール合成の経時的変化も二相性を示すこと、そして、 IP_3 の遊離のピークが30秒前後のみに、さらに、 PIP_2 の分解が15~30秒間においてのみ認められることから、第1期では、 PIP_2 が分解されて、ジアシルグリセロールと IP_3 が産生、そして、ジアシルグリセロールがリン酸化されてホスファチジン酸が合成される過程の亢進である。さらに、 $[^3H]$ PIP_2 と赤血球膜をインキュベーションすると、このリン脂質は分解され、 $[^3H]$ IP_3 を遊離するのに対して、 α 毒素は、この分解活性を示さないが、赤血球膜のこの活性を促進する作用が認められる。従って、毒素による内因性 PIP_2 特異的ホスホリパーゼCの活性化機構が働いていると考えられる¹⁴⁾。すなわち、第1期においては、 α 毒素によって血球膜の内因性ホスホリパーゼCが活性化され、 PIP_2 の分解が亢

進することになる。

α 毒素による第2期におけるホスファチジン酸産生の経時的変化は、 PIP_2 の分解と IP_3 の遊離の経時的変化と一致しないことから、この過程においては、ホスホリパーゼCの関与はないと考えられる。動物細胞におけるホスファチジン酸合成は、ホスホリパーゼCの活性化によって産生されるジアシルグリセロールがジアシルグリセロールキナーゼによってリン酸化されることによると考えられてきた。しかしながら、最近、産生されるジアシルグリセロールの脂肪酸組成が PIP_2 よりもPCの脂肪酸組成に近似、そして、細胞刺激によってホスホリルコリンとコリンの遊離する系が明らかにされて以来、アゴニスト刺激によって、ホスホリパーゼDが活性化され、PCがホスファチジン酸に分解され、さらに、ホスファチ

ジン酸ホスファターゼによりジアシルグリセロールへと変換、さらに、その産物がリン酸化されてホスファチジン酸の合成される過程が明らかにされてきた⁵⁸⁾。現在では、ホスホリパーゼDは、種々の組織、細胞に存在し、細胞内情報伝達系に関与する酵素の一つとして認識されている。ホスホリパーゼDは、グリセリン脂質の3位に存在するリン酸エステル部分を水解し、ホスファチジン酸を生成するが、この反応系に第1級アルコールが存在すると、グリセリン脂質のホスファチジル基をアルコールに転移する反応、すなわち、ホスファチジル基転移反応を示すことが知られている⁵⁸⁾。 α 毒素による第2期でのホスファチジン酸産生は、エタノールなど第1級アルコールの添加で阻害されること、ホスファチジン酸ホスファターゼを阻害するプロプラノロール、スフィンゴシンは、第2期におけるジアシルグリセロール、ホスファチジン酸産生を阻止すること、さらに、 $[^3\text{H}]$ エタノール存在下赤血球膜と毒素をインキュベーションすると、標識ホスファチジルエタノールが産生することから、第2期は、赤血球膜の内因性ホスホリパーゼDの活性化によるホスファチジン酸産生過程であると考えられる¹⁴⁾。そこで、種々の動物細胞で報告されているホスホリパーゼDを介するリン脂質代謝系が α 毒素によって活性化

されて、毒素作用と関連すると推察される。

細胞内情報伝達系には、GTP結合タンパク質(Gタンパク質)の介在する系が多く認められており、ホスホリパーゼCの活性化としては、トロンビン⁵⁹⁾、アンジオテンシンII⁶⁰⁾が知られている。 AlF_4^- は、Gタンパク質に結合しているGDPのピロリン酸部と結合して、GTPの γ 位のリン酸に類似した構造を取り、Gタンパク質の α サブユニットにGTPが結合した状態、すなわち、Gタンパク質の活性化状態を引き起こすと報告されている⁶¹⁾。 AlF_4^- は、 α 毒素による第1期でのホスファチジン酸産生を促進し、さらに、非加水分解性GTPアナログ、GTP γ Sは、 α 毒素によるジアシルグリセロール、 IP_3 の産生を活性化する⁶²⁾。加えて、Gタンパク質の α サブユニットをADPリボシル化する百日咳毒素は、毒素による第1期でのホスファチジン酸産生を阻害し、そして、血球膜に存在する約41KDaのタンパク質をADPリボシル化した。これらの知見から、 α 毒素による第1期でのホスファチジン酸合成は、図7に示すように、Gタンパク質を介して引き起こされると結論される⁶²⁾。通常、百日咳毒素によってGタンパク質の α サブユニットがADPリボシル化されると、Gタンパク質は、受容体との共役能を消失するため、受容体に活性物質が結合刺激しても、そ

図7 α 毒素によるホスファチジン酸合成機構

の情報がGタンパク質を介して効果器(酵素)に伝達されなくなると考えられている⁶³⁾。この考えに従うと、 α 毒素の受容体は確認されていないが、本毒素の結合する受容体が赤血球膜に存在することになる。我々が作成したホスホリパーゼC活性の消失、あるいは、著しく減少した変異毒素(H68G, H126G, H136G, H148G)は、溶血作用も同様に消失、減少することから、本毒素による溶血作用のステップとして、毒素によるリン脂質の分解が重要であることは自明であるので、この作用に関連して受容体を介するGタンパク質の活性化が如何に関わっているか、“ α 毒素の構造と活性”の項の内容と考え合わせ、興味ある問題である。

α 毒素によって内因性ホスホリパーゼCが活性化されると、ジアシルグリセロールが産生される。ジアシルグリセロールは、プロテインキナーゼCを活性化することが知られている⁵⁸⁾。一方、ホルボールエステル(プロテインキナーゼC活性化剤)は、毒素による第1期でのホスファチジン酸産生を阻害、H-7(プロテインキナーゼC阻害剤)は、そのホスファチジン酸産生を促進、さらに、ホルボールエステルを用いてのダウンレギュレーションによって(プロテインキナーゼC活性を低下させる処置)、そのホスファチジン酸産生が促進した。また、赤血球を毒素処理すると、血球膜中のプロテインキナーゼC活性が著しく上昇した。従って、 α 毒素による第1期でのホスファチジン酸産生が短時間のうちに急速に減少することは、ホスホリパーゼCの活性化によって産生されるジアシルグリセロールがプロテインキナーゼCを活性化し、その結果、ホスホリパーゼC活性がフィードバック阻害されると考えられる⁶²⁾。

α 毒素による第2期でのホスファチジン酸産生、また、エタノール存在下におけるホスファチジルエタノール産生は、第1期終了直後にGTP γ S, AIF $_4^-$, ホルボールエステル(PMA, PDBu)を添加しても影響されないが、本毒素による血球膜処理開始前に、GTP γ S, AIF $_4^-$ を添加すると、著しく亢進する。従って、この第2期におけるホスホリパーゼDの活性化は、Gタンパク質、あるいは、プロテインキナーゼCの活性化とは関係なく、第1期で引き起こされる一連のリン脂質代謝

系の亢進に関連していると思われる。 α 毒素によるウサギ赤血球における第1期と第2期のホスファチジン酸産生は、いずれも、毒素処理開始時におけるGTP γ Sの添加量に依存して増加し、GDP β Sの用量に依存して低下する。同様に、 α 毒素による溶血作用もGTP γ Sの添加で亢進し、GDP β Sで抑制される。この事実は、 α 毒素によって誘導される溶血もホスファチジン酸産生と同様Gタンパク質を介するホスホリパーゼCの活性化機構で制御されていることを示している。

α 毒素の溶血活性の初期ステップは、本毒素の酵素活性によって、最初、膜のリン脂質が分解され、その刺激(受容体も関係していると推察する)を介するGタンパク質によって内因性ホスホリパーゼCが活性化、この結果、リン脂質代謝が亢進、この影響を受け、ホスホリパーゼDも活性化され、一連の代謝系が亢進する過程と推察される。ただし、 α 毒素によって引き起こされる一連のリン脂質代謝系が溶血作用、すなわち、膜破壊に如何に関わっているかは不明であり、この点に関しては、生体膜の安定化機構とも関連し、今後の大きな問題と考える。

文 献

- 1) McDonel, J.L. (1986): Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. 477-517, In Dorner, F. and Drews, J. [eds.], Pharmacology of Bacterial Toxins, Pergamon Press.
- 2) Nagahama, M., Kobayashi, K., Ochi, S., and Sakurai, J. (1991): Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol. Lett. 84, 41-44.
- 3) Bullen, J.J. (1970): Role of toxins in host-parasite relationship. 233-276, In Ajl, S.J., Kadis, S. and Montie, T.C. [eds.], Microbial toxins, Vol. I, Academic Press, New York and London.
- 4) Smith, L.D. and Gardner, M.V. (1950): The anomalous heat inactivation of *Clostridium perfringens* lecithinase. Arch. Biochem. Biophys. 25, 54-60.
- 5) Arbuthnott, J.P. (1970): Staphylococcal α -toxin. 189-236, In Montie, T.C., Kadis, S. and Ajl, S.J. [eds.], Microbial Toxins, Vol.

- III, Academic Press, New York and London.
- 6) Miwatani, T., Takeda, Y., Sakurai, J., Yoshihara, A., and Taga, S. (1972): Effect of heat (Arrhenius effect) on crude hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **6**, 1031-1033.
- 7) MacFarlane, M.G. and Knight, B.C.J.G. (1941): The biochemistry of bacterial toxins. I. The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem. J.* **35**, 884-902.
- 8) Ispolatovskaya, M.V. (1971): Type A *Clostridium perfringens* toxin. 109-158, *In* Kadis, S., Montie, T.C. and Ajl, S.J. [eds.], *Microbial Toxins*, Vol. II A, Academic Press, New York and London.
- 9) Kurioka, S. and Matsuda, M. (1976): Phospholipase C assay using *p*-nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Anal. Biochem.* **75**, 281-289.
- 10) de Gier, J., de Hass, G.H., and van Deenen, L.L.M. (1961): Action of phospholipases from *Clostridium welchii* and *Bacillus cereus* on red-cell membranes. *Biochem. J.* **81**, 33p-34p.
- 11) van Deenen, L.L.M., de Haas, G.H., Heemskerk, C.H. Th., and Meduski, J. (1961): Hydrolysis of synthetic phosphatides by *Clostridium welchii* phosphatidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**, 183-188.
- 12) Bangham, A.D. and Dawson, R.M.C. (1962): Electrokinetic requirements for the reaction between *Cl. perfringens* α -toxin (phospholipase C) and phospholipid substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 103-115.
- 13) MacFarlane, M.G. (1950): The biochemistry of bacterial toxins. 5. Variation in haemolytic activity of immunologically distinct lecithinases towards erythrocytes from different species. *Biochem. J.* **47**, 270-279.
- 14) Sakurai, J., Ochi, S., and Tanaka, H. (1993): Evidence for coupling of *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced hemolysis to stimulated phosphatidic acid formation in rabbit erythrocytes. *Infect. Immun.* **61**, 3711-3718.
- 15) Ikezawa, H. (1963): The kinetic analysis of hemolysis by *Clostridium perfringens* (*Cl. welchii*) α -toxin (phospholipase C). *J. Biochem.* **54**, 301-311.
- 16) Wiseman, G.M. (1970): The beta- and delta-toxins of *Staphylococcus aureus*. 237-263, *In* Montie, T.C., Kadis, S. and Ajl, S.J. [eds.], *Microbial Toxins*, Vol. III, Academic Press, New York and London.
- 17) Oakley, C.L. and Warrack, G.H. (1941): Factors affecting the activity of the α -toxin of *Cl. welchii*. *J. Path. Bact.* **53**, 335-370.
- 18) Ikezawa, H., Taguchi, R., Asahi, Y., and Tomita, M. (1982): The physiological actions of bacterial phospholipases C on eucaryotic cells and their membranes. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **1**, 223-255.
- 19) Ikezawa, H. and Murata, R. (1964): Comparative kinetics of hemolysis of mammalian erythrocytes by *Clostridium perfringens* α -toxin (phospholipase C). *J. Biochem.* **55**, 217-224.
- 20) Meduski, J.W. and Hochstein, P. (1972): Hot-cold hemolysis. The role of positively charged membrane phospholipids. *Experimentia* **28**, 565-566.
- 21) Coleman, R. and Bramley, T.A. (1975): Hydrolysis of erythrocyte membrane phospholipids by a preparation of phospholipase C from *Clostridium welchii*. Deactivation of (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase and its reactivation by added lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **382**, 565-575.
- 22) Titball, R.W. (1993): Bacterial phospholipase C. *Microbiol. Rev.* **57**, 347-366.
- 23) Barzaghi, G., Cerletti, C., and de Gaetano, G. (1988): Phospholipase C from *Clostridium perfringens* induces human platelet aggregation in plasma. *Thromb. Haemostas.* **59**, 236-239.
- 24) Chap, H. and Douste-Blazy, L. (1974): Réaction de libération plaquettaire induite par la phospholipase C. *Eur. J. Biochem.* **48**, 351-355.
- 25) Chap, H., Lloveras, J., and Douste-Blazy, L. (1971): Aggregating effect of *Clostridium welchii* phospholipase C.C.R. *Hebd. Séances Acad. Sci. Sér. D Sci. Nat. (Paris)*, **273**, 1452-1455.
- 26) Huzoor-Akbar, Navran, S.S., Chang, J., Miller, D.D., and Feller, D.R. (1982): Investigation of the effects of phospholipase C on human platelets. Evidence that aggregation

- induced by phospholipase C is independent of prostaglandin generation, released ADP and is modulated by cyclic AMP. *Thromb. Res.* **27**, 405-417.
- 27) Chap, H. J., Zwaal, R.F.A., and van Deenen, L.L.M. (1977): Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **467**, 146-164.
 - 28) Otnaess, A-B. and Holm, T. (1976): The effect of phospholipase C on human blood platelets. *J. Clin. Invest.* **57**, 1419-1425.
 - 29) Mauco, G., Chap, H., Simon, M-F., and Douste-Blazy, L. (1978): Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C- and thrombin-treated platelets. Possible involvement of platelet lipase. *Biochimie* **60**, 653-661.
 - 30) Navran, S.S., Romstedt, K., Chang, J., Miller, D.D., Feller, D.R., and Huzoor-Akbar (1984): Human platelet activation by bacterial phospholipase C is mediated by phosphatidylinositol hydrolysis but not generation of phosphatidic acid. Inhibition by a selective inhibitor of phospholipase C. *Thromb. Res.* **33**, 499-510.
 - 31) Ellner, P.D. (1961): Fate of partially purified ^{14}C -labeled toxin of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **82**, 275-283.
 - 32) MacFarlane, M.G. and Datta, N. (1954): Observations on the immunological and biochemical properties of liver mitochondria with reference to the action of *Clostridium welchii* toxin. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **35**, 191-202.
 - 33) Grossman, I.W., Heitkamp, D.H., and Sacktor, B. (1967): Morphologic and Biochemical effects of *Clostridium perfringens* alpha toxin on intact and isolated skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Pathol.* **50**, 77-88.
 - 34) Lodge, S. and Leach, G.D.H. (1973): The effects of phospholipase C on excitation-contraction coupling mechanisms in smooth muscle. *J. Pharm. Pharmac.* **25**, 864-871.
 - 35) Knickelbein, R.G. and Rosenberg, P. (1980): Differential phospholipid hydrolysis by phospholipase C in sarcolemma of muscles with calcium or sodium generated action potentials. *Toxicon* **18**, 71-86.
 - 36) Philipson, K.D., Frank, J.S., and Nishimoto, A.Y. (1983): Effects of phospholipase C on the Na^+ - Ca^{2+} exchange and Ca^{2+} permeability of cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* **258**, 5905-5910.
 - 37) Regal, J.F. and Shideman, F.E. (1980): The effect of phospholipase C on the responsiveness of cardiac receptors. II. The specificity of phospholipase C inhibition of receptor-mediated responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**, 291-296.
 - 38) Tselukh, A.V., Koniskikh, E.A., Shtefan, E., and Shtykhno, M. (1977): Changes in microcirculation during the combined effect of *Clostridium perfringens* toxin, type A and the metabolic products of *Clostridium butyricum*. *Byull. Eksp. Biol. Med.* **84**, 552-554.
 - 39) Sugahara, T., Takahashi, T., Yamaya, S., and Ohsaka, A. (1977): Vascular permeability increase by α -toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Toxicon* **15**, 81-87.
 - 40) Ohsaka, A., Tsuchiya, M., Oshio, C., Miyairi, M., Suzuki, K., and Yamakawa, Y. (1978): Aggregation of platelets in the mesenteric micro-circulation of the rat induced by α -toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Toxicon* **16**, 333-341.
 - 41) Sakurai, J., Oshita, Y., and Fujii, Y. (1985): Effect of *Clostridium perfringens* alpha toxin on the cardiovascular system of rats. *Toxicon* **23**, 905-912.
 - 42) Rood, J.I. and Cole, S.T. (1991): Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* **55**, 621-648.
 - 43) Titball, R.W., Hunter, S.E.C., Martin, K.L., Morris, B.C., Shuttleworth, A.D., Rubidge, T., Anderson, D.W., and Kelly, D.C. (1989): Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* **57**, 367-376.
 - 44) Okabe, A., Shimizu, T., and Hayashi, H. (1989): Cloning and sequencing of a phospholipase C gene of *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 33-39.
 - 45) Krug, E.L. and Kent, C. (1984): Phospholipase C from *Clostridium perfringens*:

- preparation and characterization of homogenous enzyme. Arch. Biochem. Biophys. **231**, 400-410.
- 46) Little, C. (1981): Effect of some divalent metal cations on phospholipase C from *Bacillus cereus*. Acta Chem. Scand. **B35**, 39-44.
 - 47) Hough, E., Hansen, L.K., Birkness, B., Jynge, K., Hansen, S., Hordik, A., Little, C., Dodson, E., and Derwerda, Z. (1989): High resolution (1.5Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. Nature (London) **338**, 357-360.
 - 48) Vallee, B.L. and Auld, D.S. (1993): New perspective on zinc biochemistry: cocatalytic sites in multi-zinc enzymes. Biochemistry, **32**, 6493-6500.
 - 49) Nagahama, M., Okagawa, Y., Nakayama, T., Nishioka, E., and Sakurai, J. (1994): Site-directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha toxin. 投稿中
 - 50) Nagahama, M., Iida, H., Nishioka, E., Okamoto, K., and Sakurai, J. (1994): Roles of the carboxy-terminal region of *Clostridium perfringens* alpha toxin. FEMS Microbiol. Lett. **120**, 297-302.
 - 51) Titball, R. W., Leslie, D.L., Harvey, S., and Kelly, D. (1991): Hemolytic and sphingomyelinase activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin are dependent on a domain homologous to that of an enzyme from the human arachidonic acid pathway. Infect. Immun. **59**, 1872-1874.
 - 52) Fujii, Y., Nomura, S., Oshita, Y., and Sakurai, J. (1986): Excitatory effect of *Clostridium perfringens* alpha toxin on the rat isolated aorta. Br. J. Pharmac. **88**, 531-539.
 - 53) Fujii, Y. and Sakurai, J. (1989): Contraction of the rat isolated aorta caused by *Clostridium perfringens* alpha toxin (phospholipase C): evidence for the involvement of arachidonic acid metabolism. Br. J. Pharmac. **97**, 119-124.
 - 54) Levine, L., Xiao, D.-M., and Little, C. (1988): Increased arachidonic acid metabolites from cells in culture after treatment with phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C from *Bacillus cereus*. Prostaglandins **34**, 633-642.
 - 55) Meyers, D.J. and Berk, R.S. (1990): Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent. Infect. Immun. **58**, 659-666.
 - 56) Sakurai, J., Fujii, Y., and Shirotani, M. (1990): Contraction induced by *Clostridium perfringens* alpha toxin in the isolated rat ileum. Toxicon **28**, 411-418.
 - 57) Sakurai, J., Nomura, S., Fujii, Y., and Oshita, Y. (1985): Effect of *Clostridium perfringens* alpha toxin on the isolated rat vas deferens. Toxicon **23**, 449-455.
 - 58) Exton, J.H. (1994): Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. Biochim. Biophys. Acta **1212**, 26-42.
 - 59) Brass, L.F., Laposata, M., Banga, H.S., and Rittenhouse, S.E. (1986): Regulation of the phosphoinositide hydrolysis pathway in thrombin-stimulated platelets by a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. Evaluation of its contribution to platelet activation and comparisons with the adenylate cyclase inhibitory protein. J. Biol. Chem. **261**, 16838-16847.
 - 60) Pfeilschifter, J. and Bauer, C. (1986): Pertussis toxin abolishes angiotensin II-induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin synthesis in rat renal mesangial cells. Biochem. J. **236**, 289-294.
 - 61) Bigay, J., Deterre, P., Pfister, C., and Chabre, M. (1987): Fluoride complexes of aluminum or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogs of the γ phosphate of GTP. EMBO J. **6**, 2907-2913.
 - 62) Sakurai, J., Ochi, S., and Tanaka, H. (1994): Regulation of *Clostridium perfringens* alpha-toxin-activated phospholipase C in rabbit erythrocyte membranes. Infect. Immun. **62**, 717-721.
 - 63) Cockcroft, S. and Thomas, G.M.H. (1992): Inositol-lipid-specific phospholipase C isozymes and their differential regulation by receptors. Biochem. J. **288**, 1-14.