

キノコの毒性タンパク質による腸管バリアー機能の破壊とその機構解明

清水 誠 (東京大学大学院農学生命科学研究科教授)

1. はじめに

食品素材の中には、細胞構造や細胞機能を傷害することによって、神経性、呼吸系、免疫系など様々な生体系に破綻を導く多様な有害物質が存在する。経口的に摂取されたそれらの有害物質は消化管の上皮細胞層を透過して体内に侵入するが、消化管の上皮細胞層が持つバリアー機能、特に細胞間のタイトジャンクション（密着結合）のために、通常はそれらの有害物質の体内への侵入はある程度以下に制限されている。しかし、近年、腸管上皮細胞層のバリアー機能が様々な要因によって変化し得ることが分かってきた^{1,2)}。もし腸管上皮細胞層のバリアー機能が破綻すれば、毒性物質やアレルゲンなど有害物質の体内への侵入が促進され、望ましくない生体反応の進行が促されることが危惧される。我々は、腸管上皮由来細胞株を用いて、腸管上皮バリアー機能に影響を及ぼす食品成分の研究を進めており、トウガラシ類に含まれるジテルペン配糖体、サポニン、あるいは細胞膜損傷性の界面活性物質など、多様な成分が様々な機構で細胞層のタイトジャンクションの状態に影響を及ぼすことを見出してきた²⁻⁶⁾。本研究ではキノコ中に見出した腸管バリアー損傷性タンパク質を題材にとり、その特性と作用機構について検討することにした。

2. 培養細胞を用いた実験系

本実験では、ヒト大腸癌由来細胞株 Caco-2 を主に用いた。Caco-2 を透過性膜 (Millicell HA;

pore size 0.45 μ m, ミリポア社, あるいは Transwell; pore size 0.45 μ m, コースター社) 上で2週間以上培養して単層を形成させた。このようにして形成された Caco-2 細胞層では各種の刷子縁膜酵素 (スクラーゼ, ペプチダーゼなど) やトランスポーター (アミノ酸, ペプチド, グルコーストランスポーターなど) の活性が発現するとともに、細胞間にはタイトジャンクションが形成される。また、粘膜側表面には微絨毛の形成も見られるなど、小腸上皮細胞様の機能が多数発現した単層となる⁷⁾。本研究では、このような細胞層を用いて、食品成分によるそのバリアー機能の変化、特にタイトジャンクションの状態変化を調べることとした。タイトジャンクションの状態変化は、タイトジャンクション部分におけるイオン透過性を指標にモニターすることが出来る。本研究では、専用の装置 (Millicell ERS; ミリポア社) を用いて細胞層の電気抵抗 (Trans epithelial electrical resistance: TEER) を測定することによってこれを評価した。

3. キノコ抽出物中の TEER 低下活性タンパク質

食用キノコとして、エノキタケ、シイタケ、ナメコの3種を取り上げ、その水抽出物を凍結乾燥した。これを300 μ g/ml になるようにハンクス液に溶解したものを Caco-2 細胞層の粘膜側に加え、TEER 値の変化を観察した。その結果、表 1 に示すように、エノキタケ抽出物のみが TEER を低下させ、エノキタケ抽出物中に細胞層のタイト

ジャンクションに変化を引き起こすものが含まれていることが示唆された。抽出物を加えて TEER が低下した細胞層では物質透過性が亢進していることが、蛍光マーカー物質 Lucifer Yellow や FITC-Dextran の粘膜側から基底膜側への透過性を測定することにより見出された (図 1)。

抽出物を加熱したり、プロナーゼ処理することによってこの活性は消失すること (表 1) から、活性成分はタンパク質であると推定された。エノキタケ水抽出液から DEAE, MonoQ を用いたイオン交換クロマトグラフィーと Superdex75 を用

いたゲル濾過を行うことにより, SDS-PAGE 上で単一な分子量約30KD の活性タンパク質を精製することに成功し, これを TEER-decreasing protein (TDP) と命名した。SDS-PAGE 上での TDP のバンドが PAS 染色で全く検出されないことから, TDP には糖鎖はほとんど結合していないと考えられ, またアルカリ性ホスファターゼ処理によって電気泳動の移動度が全く変化しないことからリン酸化も受けていない単純タンパク質であると推定された (データ省略)。TDP は 0.5 ng/ml 以下というきわめて低濃度で Caco-2 細胞層の TEER を 20-30% までに低下させること

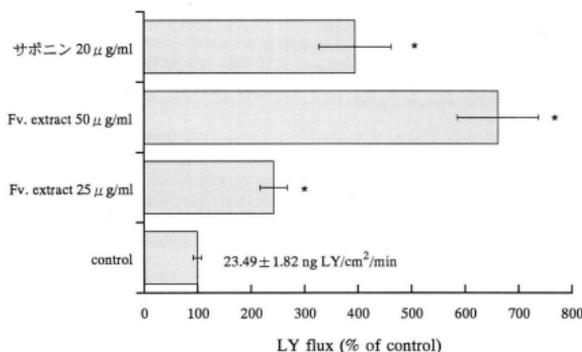


図 1 エノキタケ水抽出試料 (Fv. extract) による Caco-2 細胞層における Lucifer yellow CH の透過性への影響
30分インキュベーション中の LY flux をコントロール (100%) に対する相対値で表示した
各値は平均値±S.D. 各群 n=4 *P<0.01 vs control

表 1 食用キノコの水抽出試料による Caco-2 細胞層の TEER の変化

Treatment	TEER 相対値 (30min/0min)
コントロール	1.194±0.023
キノコ試料 (0.3mg/ml)	
エノキタケ	0.071±0.004*
シイタケ	1.046±0.010
ナメコ	1.357±0.055
エノキタケ水抽出試料 (0.3mg/ml)	
5分煮沸処理後	1.193±0.014
プロナーゼP処理後	1.098±0.068

TEER の相対値は (30分間インキュベーション後の TEER 値) / (処理時間 0 分時の TEER 値) プロナーゼP処理では, 試料を 1/10 (w/w) の酵素と HBSS 中に懸濁して 37°C で 30 時間インキュベーションした。各値は平均値±S.D. 各群 n=3 *P<0.01 vs control

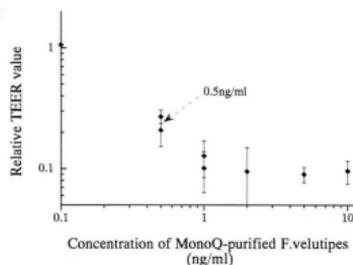


図 2 エノキタケの MonoQ 精製成分の Caco-2 細胞層の TEER への影響

30分間インキュベーション後の TEER を 0 分時に対する相対値で示した。
各値は平均値±S.D. 各群 n=4

が認められた (図2)。

4. TDP の作用機構

TEER の低下を引き起こすような濃度の TDP (あるいはエノキタケ抽出物) を加えても、Caco-2 細胞からの乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出や細胞の呼吸活性には有意な変化は起こらなかった (データ省略)。このことから、TDP が細胞死を誘導して細胞単層から細胞を剥離させるために TEER が低下するといった機構の存在は否定された。キノコや細菌の毒性成分の作用のひとつに、細胞膜に小孔を形成し、細胞内外のイオン濃度のバランスを崩して細胞を破壊させる colloid osmotic lysis という機構が存在することが知られており、このような毒性物質は赤血球に対して

溶血活性を示す。エノキタケ中にも溶血活性を示す毒素フラムトキシンの存在が Lin^らによって以前報告されていることがわかったので、TDP が同様の機構で細胞に影響を及ぼしているのではないかと考え、以下の2つの実験を行った。

(1) 細胞層を浸透圧調節物質 (ラフィノース) を含む溶液中で平衡化した後、粘膜側に TDP を加えて TEER の変化を観察した。ラフィノースを加えて細胞外液の浸透圧を上昇させることにより TEER の低下は観察されないようになった (図3)。

(2) 同様に粘膜側の溶液中に、小孔を塞ぐような様々のサイズのポリエチレングリコール (PEG) を添加しておき、その時の TDP の作用の様子を観察した。その結果、PEG のサイズが

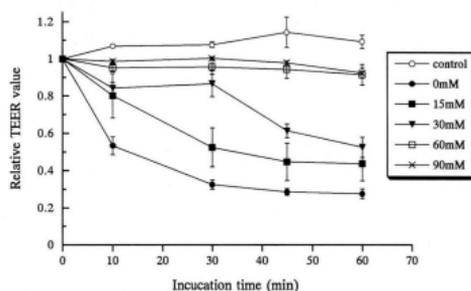


図3 Raffinose の存在下でのエノキタケ MonoQ 精製画分 (0.5mg/ml) の Caco-2 細胞層の TEER への影響
各値は平均値±S.D. 各群 n=3

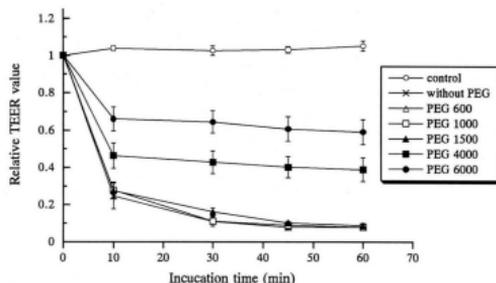


図4 PEG (15mM) 存在下でのエノキタケ MonoQ 精製画分 (0.5mg/ml) の Caco-2 細胞層の TEER への影響
各値は平均値±S.D. 各群 n=3

大きくなると(分子量4000以上) TDPによるTEERの低下が抑制されるようになった(図4)。

これらの結果は、TDPが細胞膜に小孔を形成し、それに伴うイオンの細胞内への流入や流出がTEERの低下を引き起こしていたことを示唆している。また、その小孔のサイズが直径3-4nm程度以上であることが、PEGの分子量とTEERの低下を抑制する活性との対応から推察された。小孔の形成がTEERの低下(すなわちタイトジャンクションの状態変化)にどのように結びついているのか、その詳細は依然として不明であるが、蛍光ラベルしたファロイジン(アクチンフィラメント結合性物質)を用いて細胞骨格中のF-アクチンの定量を行ったところ、TDP処理によるTEERの低下に伴って、F-アクチンの量が減少することが見出された(図5)。このことから、細胞膜への小孔の形成→細胞内への水やカルシウムイオンの流入→細胞の膨張→F-アクチン量の減少→細胞膜裏打ち蛋白質の変化→タイトジャンクションの状態変化→物質透過性の亢進という一連のプロセスが進行しているのではないかと推察された。

5. TDPの構造の解析

精製したTDPのN末端アミノ酸配列を調べた

ところ、PQVKTSWEDLANLGWPIQであることがわかった。そこで、この配列を基に、3'-RACE法、5'-RACE法によりこのタンパク質をコードするcDNAをクローニングした。cDNAクローニングにより推定された活性タンパク質のアミノ酸配列は開始Metを除き271アミノ酸からなり、分子量は30,095であった。これは前章で推定した精製タンパク質の分子量とほぼ一致していた。データベース上のタンパク質とのホモロジー検索を行ったところ、今回得られた一次構造と有意に相同性を示すものを見出すことは出来なかった。また、タンパク質の機能的領域を検索するモチーフ検索でもこのタンパク質の構造とTEER低下活性を結びつけるものは見いだせなかった。

一方、富田敏夫教授(東北大)のグループがエノキタケの溶血毒素フラムトキシンの研究を進めており、その特性に関する論文が昨年発表された⁹⁾。彼らは溶血活性を指標にしてエノキタケからフラムトキシンを単離精製し、そのN末端配列を明らかにしたが、その配列はPQVKTSWEであり、我々の結果と完全に一致していることが明らかになった。そこで、TDPに溶血活性があるかどうかをヒト赤血球を用いて検討したところ、溶血活性を持つことが確認され(図6)、ここにTDPとフラムトキシンは同一タンパク質である

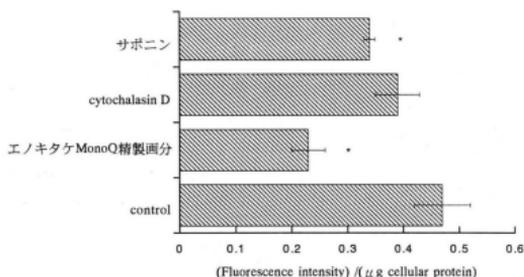


図5 エノキタケ MonoQ 精製画分, cytochalasin D, サポニンの Caco-2 細胞層の F-アクチンへの影響
エノキタケ MonoQ 精製画分は 0.5ng/ml, cytochalasin D は 5 μM, サポニンは 40 μg/ml で 30 分間処理した。各値は平均値 ± S.D. 各群 n=4 *P < 0.01 vs control

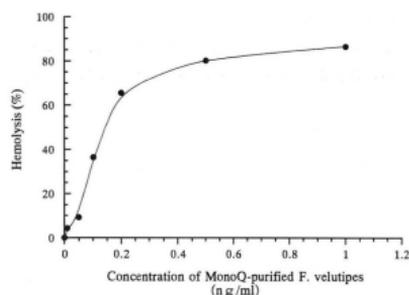


図6 エノキタケのMonoQ精製画分のラット赤血球溶血活性 37°Cで15分間処理した時の溶血度を示した。

可能性が強く示された。なぜ、血球を容易に破壊するTDPがCaco-2細胞に対しては小孔を形成するのみで、顕著な細胞損傷が観察できないのか興味深い、おそらく腸管上皮細胞は血球細胞に比べてはるかに複雑で強固な構造を持っていることがその原因であろうと推察される。すなわち、腸管上皮細胞には多数の微絨毛が存在するために、colloid osmotic lysisの際に生じる体積膨脹を容容する余裕が残っていると考えられること、細胞内の骨格構造が堅固であり、体積膨脹にある程度抵抗する能力があることなどが両者のTDPに対する反応性の差を生み出しているものと考えられる。

6. TDP 組み換え体の発現の試み

TDPの構造と作用機構(膜への小孔形成)の関連を解析するためにcDNAを作成したが、これを用いたゲノムDNAサザン分析の結果、TDPをコードする遺伝子は単一であることが明らかになった。次に、組み換え体の大腸菌による発現を試みた。cDNAのTDP相当部分をPCRによって増幅した後、pGEX-3Xにサブクローンし、これを大腸菌AD202株に導入した。グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として発現を目指し、発現タンパク質

を得ることが出来たが、現在のところTEER低下活性を持った組み換え体の作成には成功していない。融合タンパク質として発現したことによる高次構造の変化などがその原因として考えられ、現在発現の方法等をあらためて検討中である。

7. まとめ

本研究の結果、食用キノコであるエノキタケの中に腸管上皮細胞層の物質透過性を変化させるタンパク質が存在し、それが実は溶血活性を持つ毒素として研究されてきた成分と同一であることが示唆された。本タンパク質は加熱によって活性を失うので、通常の食事は危険性は無いが、キノコの生食によって消化管傷害が起こることにはこのようなタンパク質の作用も関係しているものと考えられる。これまで溶血活性を持つ毒性物質の研究は多数なされてきたが、それらの腸管上皮への作用を調べた例はほとんどなかった。本研究により、溶血毒素が腸管上皮の透過性を変化させることが偶然明らかにされたが、溶血毒素の中には耐熱性の安定な構造を持つものもあり、これらが消化管内に入った場合には、腸管上皮のバリアー機能を破壊し、有害物質の体内への侵入を促進する要因の一つになる可能性が本研究の結果から明らかになった。

文 献

- Schneeberger, E.E. and Lynch, R.D. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, L647-661.
- 清水 誠, 橋本 啓, 佐竹 真, 奈良井朝子 (1999) *蛋白質核酸酵素*, **44**, 874-880.
- 清水 誠 (1998) *栄養と健康のライフサイエンス*, **3**, 74-80.
- Hashimoto, K., Nakayama, T., Kawagishi, H. and Shimizu, M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1323**, 281-290.
- Narai, A., Arai, S. and Shimizu, M. (1997) *Toxic. in Vitro* **11**, 347-354.

-
- 6) Shimizu, M. (1999) *Nahrung/Food* **43**, S154-S158.
- 7) 清水 誠 (1997) *バイオサイエンスとインダストリー* **55**, 852-854.
- 8) Lin, J.Y., Jeng, T.W., Chen, C.C., Shi, G.Y. and Tung, T. C. (1974) *Nature* **252**, 235-237.
- 9) Tomita, T., Ishikawa, D., Noguchi, T., Katayama, E. and Hashimoto, Y. (1998) *Biochem. J.* **333**, 129-137.

Disruption of the intestinal epithelial barrier function by a toxic protein from mushroom and its mechanisms

Makoto Shimizu (Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

A new protein that decreases transepithelial electrical resistance (TEER) in the human intestinal Caco-2 cell monolayer was found in a water-soluble fraction of the mushroom *Flammulina verutipes* (Enokitake). This protein, termed TEER-decreasing protein (TDP), is not cytotoxic, but rapidly increases the tight junctional permeability for water soluble marker substances such as Lucifer Yellow (Mr 457) through the paracellular pathway. TDP was isolated from the water-extract by chromatographic means and was found to be a simple, non-glycosylated/non-phosphorylated protein of approx. 30KDa. It is likely that TDP forms small pores with a diameter larger than 3nm on the cell membrane of Caco-2. This may cause an influx of ions, resulting in changes in the cytoskeletal architecture and opening of the paracellular route. The cDNA coding for TDP was cloned by 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends. The ORF encodes a protein with 272 amino acid residues showing no homology to known proteins. However, it was revealed that the N-terminal sequence of purified TDP is identical to the recently reported N-terminal sequence of flammutoxin, a membrane-perturbing hemolytic protein from Enokitake. This suggests that a hemolytic toxin may affect the intestinal epithelial permeability when orally administered.