

## Asp-hemolysin のマクロファージ細胞毒性に対する低密度リポタンパク質及びその酸化修飾体の影響

熊谷 健,<sup>\*,a</sup> 永田隆之,<sup>a</sup> 工藤陽一,<sup>b</sup> 福地祐司,<sup>c</sup> 蝦名敬一,<sup>a</sup> 横田勝司<sup>a</sup>  
東北薬科大学第一衛生化学教室,<sup>a</sup> JR 仙台病院衛生試験室,<sup>b</sup>  
仙台赤十字病院薬剤部<sup>c</sup>

## Effects of Low Density Lipoprotein and Oxidized Low Density Lipoprotein on the Cytotoxic Activity of Asp-hemolysin to Murine Macrophages

Takeshi KUMAGAI,<sup>\*,a</sup> Takayuki NAGATA,<sup>a</sup> Yoichi KUDO,<sup>b</sup> Yuji FUKUCHI,<sup>c</sup>  
Keiichi EBINA,<sup>a</sup> and Katsushi YOKOTA<sup>a</sup>

The First Department of Hygienic Chemistry, Tohoku Pharmaceutical University,<sup>a</sup> 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan, Hygiene Research Laboratory, Sendai Hospital of East Japan Railway Company,<sup>b</sup> 1-3-1 Itsutsubashi, Aoba-ku, Sendai 980-8508, Japan, and Japanese Red Cross Sendai Hospital,<sup>c</sup> 2-43-3 Yagiyamahon-cho, Taihaku-ku, Sendai, 982-8508, Japan

(Received November 10, 2000; Accepted February 6, 2001)

We examined the effects of human low density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (Ox-LDL) on the cytotoxic activity of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus* Fresenius-Muramatsu strain to mouse peritoneal macrophages (M $\phi$ ). The inhibitory effects of LDL and Ox-LDL on the cytotoxic activity of Asp-hemolysin to M $\phi$  increased in a dose-dependent manner, and the effect of Ox-LDL was greater than the inhibitory effect of LDL. Furthermore, the binding of Asp-hemolysin to LDL or Ox-LDL was observed by western blot analysis of the culture medium. These results suggest that the inhibition by LDL or Ox-LDL on the cytotoxic activity of Asp-hemolysin to M $\phi$  was due to the binding of LDL or Ox-LDL to Asp-hemolysin in the culture medium.

**Key words**—Asp-hemolysin; cytotoxic activity; low density lipoprotein; oxidized-low density lipoprotein

### 緒 言

Asp-hemolysin は *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) 感染の発症及び進展における菌側の病原性因子としての関与が強く示唆されている易熱性タンパク質毒素で、cDNA 塩基配列から成熟 Asp-hemolysin は 126 個のアミノ酸から成ることが推定されている。<sup>1,2)</sup>

また Asp-hemolysin は、様々な生物活性を有しているが、その 1 つに各種動物赤血球に対する *in vitro* での溶血作用が明らかとなっている。著者らは Asp-hemolysin の溶血活性が血漿存在下で阻害されることから、血漿中の阻害成分の同定並びに阻害機構の解析を行い、低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein: LDL) の Asp-hemolysin との結合がその活性阻害メカニズムであることを示した。<sup>3,4)</sup> さらに Asp-hemolysin と LDL との相互作用

の解析において、LDL の酸化修飾体である酸化 LDL (Ox-LDL) が LDL よりも強い溶血活性阻害を示すとともに、Ox-LDL も LDL と同様に Asp-hemolysin 結合性を示すことを報告した。<sup>5,6)</sup>

一方、Asp-hemolysin は *A. fumigatus* 感染における生体側防御機構を担っているマクロファージ (M $\phi$ ) に対し細胞毒性を示すほか、培地中の血清による細胞毒性の阻害が認められている<sup>7)</sup> が、本毒素の M $\phi$  細胞毒性に対する生体成分の影響については未だ不明な点が多い。そこで本論文では感染促進因子の 1 つである Asp-hemolysin の M $\phi$  細胞毒性に対する LDL 及び Ox-LDL の阻害活性について報告する。

### 実 験 の 部

**Asp-hemolysin の精製** Asp-hemolysin は、*Aspergillus fumigatus* Fresenius-村松株の培養ろ液及

び菌体抽出液から既報<sup>2)</sup>に従い精製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示すことを確認した。

**LDL 及び Ox-LDL の調製** LDL ( $d=1.019-1.063$  g/ml) は正常ヒト血漿から Hatch と Lees の超遠心分離による段階的分画浮上法<sup>8)</sup>を用い調製した。得られた LDL 画分は、0.3 mM EDTA 含有 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 中で透析し、ろ過滅菌後、Lowry 法<sup>9)</sup>を用いタンパク質の定量を行った。また、PBS 中でさらに透析を行った LDL 溶液を用い、Ox-LDL を調製した。Ox-LDL は、タンパク質量として 200  $\mu$ g/ml の LDL 溶液に、5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> を加え、37°C、2 h 反応後、EDTA 及び butylated hydroxytoluene をそれぞれ 0.3 mM、25  $\mu$ M となるように加え酸化反応を停止させることで作製した。

Ox-LDL の修飾程度の確認は、アガロースゲル電気泳動を用いた LDL に対する相対的な電気泳動移動度 (REM) の測定及び 1,1,3,3-tetraethoxypropane を標準物質として用いた thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) の測定による過酸化脂質量を定量<sup>10)</sup>することで行った。実験に使用した Ox-LDL の REM は 1.7 であった。また、LDL、Ox-LDL の TBARS 値は、それぞれ  $1.02 \pm 0.11$ 、 $61.38 \pm 6.88$  nmol MDA/mg protein であった。

**マウス腹腔 M $\phi$  の培養** 5-7 週齢雄性 ddY 系マウス (日本 SLC) のマウス腹腔内に Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; GIBCO BRL) を注入し腹腔細胞を採取した。採取した細胞は D-PBS で洗浄後、AIM V<sup>®</sup>培地 (GIBCO BRL) に懸濁させ、 $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度に調整した。調整した細胞懸濁液は 96 well の tissue culture plate (FALCON) に  $1 \times 10^5$  cells/well となるように播き、5% CO<sub>2</sub>-95% air 下で 37°C、2 h 培養後 D-PBS で洗浄し、実験に供した。また plate に付着した細胞は、ギムザ染色並びにラテックス粒子を用いた貪食能を測定することで 97% 以上が M $\phi$  であることを確認した。

**細胞毒性試験** 96 well plate で培養した M $\phi$  に Asp-hemolysin 30  $\mu$ g/ml を含む培地溶液を 100  $\mu$ l 加え、5% CO<sub>2</sub>-95% air 下で 37°C、1 h 培養し、D-PBS で洗浄後、再度培地溶液を加え、Cell counting kit (同仁化学) を用い、既報<sup>7)</sup>に従って M $\phi$  生細胞

数の測定を行った。すなわち、各 well に試薬溶液 (5 mM WST-1, 0.2 mM 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate, 20 mM HEPES, pH 7.4) 10  $\mu$ l を添加し、2 h 培養後の 450 nm における吸光度を測定した。Asp-hemolysin の細胞毒性は、Asp-hemolysin 非添加培地培養 M $\phi$  における吸光度に対する Asp-hemolysin 添加培地培養 M $\phi$  での吸光度の割合から評価した。また、あらかじめ各濃度の LDL 又は Ox-LDL を含む培地に Asp-hemolysin を添加し、5% CO<sub>2</sub>-95% air 下で 37°C、2 h 反応後の培地溶液を各 well に添加し、同様に試験を行った。なお、コントロール実験には、LDL 又は Ox-LDL のみを含む培地を使用した。

**ウェスタンブロット法を用いた Asp-hemolysin と LDL, Ox-LDL との相互作用の解析** Asp-hemolysin (30  $\mu$ g/ml) と各種濃度 (100, 250, 500  $\mu$ g/ml) の LDL 又は Ox-LDL を含む M $\phi$  培養上清液について、その一定量を用いポリアクリルアミドゲル電気泳動 (4% ゲル) を行った後、Immobilon P membrane (Millipore) に 100 V、3 h、4°C の条件下でブロッキングを行った。その後、5% スキムミルク含有 TBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl] でブロッキングした membrane について、抗 Asp-hemolysin ウサギ抗血清 (3000 倍希釈) を 4°C、12 h、次いで抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (Cappel) (3000 倍希釈) を 21°C、30 min, peroxidase anti-peroxidase complex (Cappel) (30000 倍希釈) を 21°C、30 min, 順次反応させた。また、それぞれの操作段階において TTBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.05% Tween 20, 150 mM NaCl] による洗浄を 5 min、3 回行った。反応陽性バンドの検出は、ECL (Enhanced chemiluminescence) Western blotting detection kit (Amersham) を用いた化学発光により同社のプロトコールに従って行った。また、同様に電気泳動を行い、泳動後のゲルをクマシー (coomassie brilliant blue R-250, CBB) 染色することで各物質の泳動位置の確認を行った。

**統計学的処理** 細胞毒性試験の結果は、Student の *t* 検定法に従って計算し、5% 未満の危険率をもって統計的有意差と認めた。

## 結果と考察

Asp-hemolysin の M $\phi$  細胞毒性に及ぼす LDL,

Ox-LDL の影響を Asp-hemolysin と LDL 又は Ox-LDL をあらかじめ培地中で反応後、その反応混液について細胞毒性試験を行うことで検討した。その結果、Fig. 1 に示すように、Asp-hemolysin 無添加系での M $\phi$  生存率 (100%) を対照とした場合、Asp-hemolysin 単独では 30% の M $\phi$  生存率を示したのに対し、LDL 添加系では加えた LDL 量に比例した生存率の有意な増加が認められ、LDL 500  $\mu$ g/ml 添加系において 55% の M $\phi$  生存率を示した。また、Ox-LDL 添加系においては LDL 添加系と同様に用量依存的な M $\phi$  生存率の増加を示し、その効果は LDL 添加系よりも強く認められ、Ox-LDL 500  $\mu$ g/ml 添加系では 86% の M $\phi$  生存率を示し、細胞毒性の消失が認められた。なお、LDL 又は Ox-LDL を単独で加えた場合、両物質は共に M $\phi$  生存率に影響を及ぼさなかった。一般に、LDL は正常血漿中に約 4 mg/ml 程度含まれていることが知られているが、Ox-LDL に関しては血漿中における存在は不明であった。しかしながら、近年 Ox-LDL の定量法の開発などにより Ox-LDL が正常血漿中にも微量存在することが報告されている<sup>11,12)</sup> ことから、LDL 並びに Ox-LDL が Asp-hemolysin の M $\phi$  細胞毒性を阻害する生体成分である可能性が示

唆された。

この LDL, Ox-LDL による Asp-hemolysin の M $\phi$  細胞毒性阻害機構を解析するため培養上清を試料とし、抗 Asp-hemolysin 抗血清を用いたウェスタンブロット法により Asp-hemolysin と LDL 及び Ox-LDL との相互作用についてさらに解析を行った。その結果、Fig. 2 に示すように LDL, Ox-LDL と同一の泳動位置に抗 Asp-hemolysin 抗血清に反応陽性を示すバンドが認められ、培養液中での Asp-hemolysin の LDL, Ox-LDL に対する直接的結合が示された。この結果は、Asp-hemolysin の M $\phi$  に対する細胞毒性が LDL, Ox-LDL と結合することにより阻害されることを示唆している。また、Ox-LDL 添加系の方が LDL 添加系に比べより強い検出シグナルが得られたことから、Fig. 1 において示した Asp-hemolysin の M $\phi$  細胞毒性試験における LDL と Ox-LDL との阻害効果の差は、Asp-hemolysin に対する LDL と Ox-LDL の結合性の差に依存することが示唆された。

一方、Asp-hemolysin の M $\phi$  に対する細胞毒性発現機構には、毒素分子中のアミノ基並びにチオール基の関与が示唆されている<sup>7)</sup> ことから、LDL, Ox-LDL の M $\phi$  に対する Asp-hemolysin 細胞毒性の阻

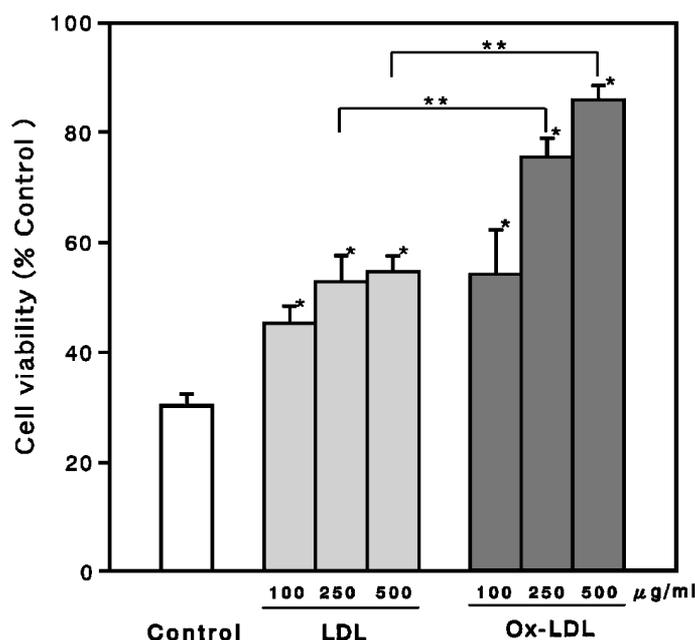
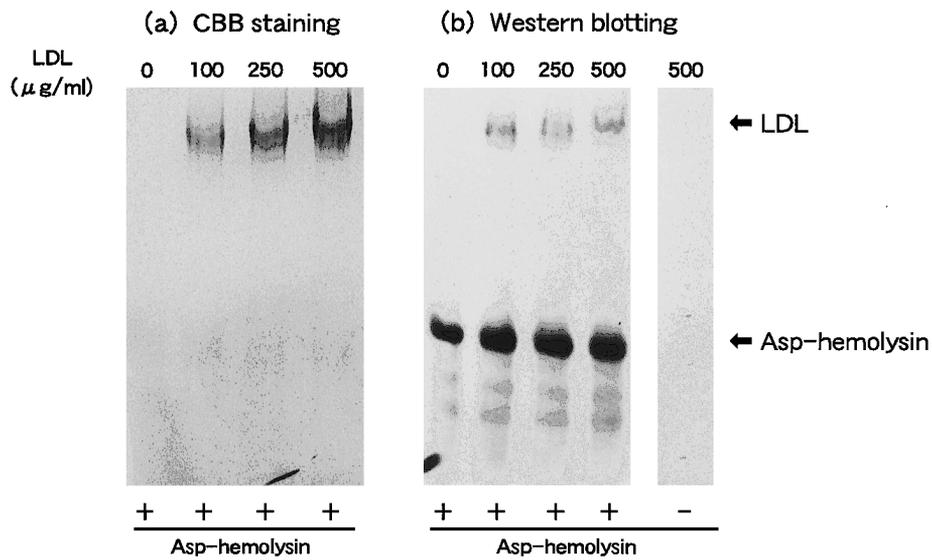


Fig. 1. Effects of LDL and Ox-LDL on Cytotoxic Activity of Asp-hemolysin to Murine Macrophages

Culture medium of macrophage was preincubated with Asp-hemolysin (30  $\mu$ g/ml) and LDL or Ox-LDL (100, 250, 500  $\mu$ g/ml, respectively) at 37°C for 2 h. Macrophages were incubated in these culture media at 37°C for 1 h. After incubation, cell viability was assessed by WST-1 assay. Values are shown as mean  $\pm$  S.E. of three separate experiments. The 100% control value was 0.559 measured as the absorbance at 450 nm. \*:  $p < 0.05$  versus the control groups. \*\*:  $p < 0.05$  versus the LDL groups. Statistical analysis was performed using the Student's  $t$ -test.

## 〔A〕 LDL



## 〔B〕 Ox-LDL

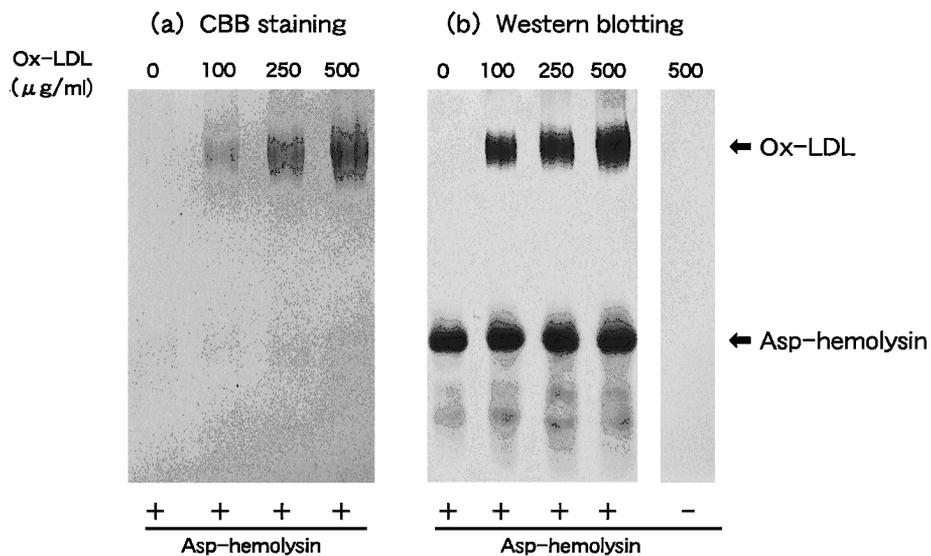


Fig. 2. Western Blot Analysis of Culture Medium

Culture medium including with Asp-hemolysin and LDL [A] or Ox-LDL [B] was electrophoresed on a 4% polyacrylamide gel. The gels were stained with CBB (a), or subjected to western blotting using rabbit anti-Asp-hemolysin antibody and detected by ECL (b). Culture medium including with LDL [A] or Ox-LDL [B] as a control was electrophoresed on a 4% polyacrylamide gel. Western blot analysis with the gels was performed as described above.

害メカニズムとして、これら物質の上記毒素活性部位への結合による細胞毒性発現のブロックが推測された。

今後は LDL, Ox-LDL の Asp-hemolysin 結合部位の詳細な解析を行うことで *A. fumigatus* 感染の発症及び進展を抑制する医薬品への応用の可能性も期待できるものと考えられる。

## REFERENCES

- 1) Ebina K., Kumagai T., Fukuchi Y., Yokota K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **38**, 155-160 (1997).
- 2) Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 148-150 (1994).

- 3) Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 547–550 (1996).
- 4) Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1380–1381 (1996).
- 5) Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *FEMS Microbiol. Lett.*, **167**, 275–280 (1998).
- 6) Kudo Y., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 549–550 (1999).
- 7) Kumagai T., Nagata T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **40**, 217–222 (1999).
- 8) Hatch F. T., Lees R. S., *Adv. Lipid Res.*, **6**, 2–63 (1968).
- 9) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275 (1951).
- 10) Yagi K., *Biochem. Med.*, **15**, 212–216 (1976).
- 11) Itabe H., Yamamoto H., Imanaka T., Shimamura K., Uchiyama H., Kimura J., Sanaka T., Hata Y., Takano T., *J. Lipid Res.*, **37**, 45–53 (1996).
- 12) Sevanian A., Bittolo B. G., Cazzolato G., Hodis H., Hwang J., Zamburlini A., Maiorino M., Ursini F., *J. Lipid Res.*, **38**, 419–428 (1997).