

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08474

研究課題名(和文) ボツリヌス神経毒素結合タンパク質NTNHAの体内侵入に寄与する生体分子の解明

研究課題名(英文) Molecules involved in intracellular trafficking of botulinum neurotoxin binding protein NTNHA

研究代表者

相根 義昌 (Sagane, Yoshimasa)

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：00624660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非毒非血球凝集素(NTNHA)は、ボツリヌス食中毒の原因物質であるボツリヌス神経毒素(BoNT)に結合するタンパク質である。NTNHAは、BoNTを消化液から保護することで毒素の経口毒性を上昇させることが知られているが、その機能については、不明な点が多い。本研究は、NTNHAの細胞内輸送に関わる分子を解明することを目的としている。本研究の成果は、NTNHAの細胞内輸送には「アクチン-ミオシン」系が関与していることを示唆した。また、NTNHAの細胞内輸送に関わる小胞が明らかとなった。本研究の成果は、ボツリヌス毒素の体内への侵入機構の解明に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Nontoxic nonhemagglutinin (NTNHA) is a protein that binds to botulinum neurotoxin (BoNT), a causative agent of botulism food poisoning. NTNHA is known to increase oral toxicity of toxin by protecting BoNT from digestive juices, but its function is remained unclear. This study aims to elucidate the molecules involved in intracellular transport of NTNHA. The results of this study suggested that "actin-myosin" system is involved in NTNHA intracellular transport. Also, vesicles involved in the intracellular transport of NTNHA were revealed. The results of this study are expected to greatly contribute to the elucidation of the invasion mechanism of botulinum toxin into the body.

研究分野：分子生物学

キーワード：ボツリヌス食中毒 細胞内輸送 経口毒素

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) は、ボツリヌス食中毒の原因物質であり、地球上で最も強い毒性を示す。

自然界で、BoNT は単独ではなく、無毒タンパク質と結合した毒素複合体として存在する (図 1)。毒素複合体は、汚染された食物と一緒に摂取されることで体内に侵入する。BoNT は、胃や腸などの消化管を通過するが、無毒タンパク質に保護されているため、消化液で分解されることなく、毒素としての機能を保持したまま小腸へ運ばれる (図 1)。

2012 年、申請者らは、無毒タンパク質のうち非毒非血球凝集素 (NTNHA) が、BoNT と共通の先祖タンパク質から進化したタンパク質であることを明らかにした (Inui et al., 2012)。NTNHA と BoNT は、溶液中で分子の一部が柔軟に変形し、互いに“組み合う”ように結合することで安定な複合体となる (Sagane et al., 2012)。この BoNT と NTNHA の複合体は酸やプロテアーゼによる分解に対して著しく高い耐性を示す。

一方、BoNT は、小腸上皮細胞の細胞層を透過することができる (Ito, et al., 2010)。しかし、NTNHA の細胞への作用については検討されておらず、細胞層透過性についても、未解明のままであった。申請者らは、BoNT と NTNHA が共通の先祖から進化した類似タンパク質であるという知見から、NTNHA が小腸上皮細胞層を透過することを予測した。そして、実際に NTNHA も単独で小腸上皮細胞層や大動脈血管内皮細胞層を透過することを見出した (Miyashita, et al., 2013; Miyashita et al., 2014)。

このことは、NTNHA が BoNT を消化液から保護するだけでなく、小腸から血管へ、そして血管から体液中へと毒素を輸送することで体内に侵入する働きを持つことを示している。

2. 研究の目的

非毒非血球凝集素 (NTNHA) は、ボツリヌス食中毒の原因物質であるボツリヌス神経毒素 (BoNT) に結合するタンパク質である。NTNHA は、BoNT を消化液から保護することで毒素の経口毒性を上昇させる。最近、申請者は NTNHA が小腸上皮細胞や大動脈血管内皮細胞の層を透過することを初めて見出し、本タンパク質が、毒素の体内侵入に関与することを初めて見出した。本申請研究では、NTNHA の細胞への結合や細胞内の輸送に関

与する生体内分子を特定し、毒素の体内への侵入メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ボツリヌス毒素複合体の産生及び精製

ボツリヌス D 型菌 4947 株 (D-4947) を透析培養法によって培養し、毒素複合体を含む培養上澄み液を得た。培養上澄み液中の毒素タンパク質は 60% 飽和硫酸アンモニウムによって沈殿させた。さらに毒素タンパク質は各種カラムクロマトグラフィーによって精製した。

(2) 組換え NTNHA タンパク質の調製

NTNHA タンパク質およびそのドメインを単位とした各種の部分タンパク質は、発現ベクター pET200-D/TOPO (Invitrogen) を用いた組換えタンパク質発現系によって作製した。His タグが連結された各種組換えタンパク質は Ni アフィニティーカラムを用いて精製した。

(3) 細胞培養

NTNHA の細胞侵入試験に用いた細胞は、ラット小腸上皮細胞株 (IEC-6) である。細胞の培養は、それぞれ常法にしたがい行った。

(4) 細胞内への取り込み試験

8 穴 Lab-Tek Chamber Slide に細胞を播種し、細胞を定着させた。これに、50-200nM に調製した NTNHA を含む HBSS を加え、4°C で 30 分間静置した。HBSS で洗浄後、37°C で 10 分間インキュベートし、NTNHA を細胞内に侵入させた。その後、4% パラホルムアルデヒドを添加し、4°C で一晩静置して、細胞を固定化した。

(5) 蛍光免疫染色

固定化した細胞は、5% ヤギ血清を含む PBS-T でブロッキングした後、細胞内の NTNHA を anti-NTNHA 抗体で標識し、Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG によって蛍光標識した。一方、細胞内のアクチンは、Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin によって、蛍光標識した。また、細胞内の myosin V、Rab4、Rab5、Rab7、Rab9、Rab11 は、それぞれ、Anti-MYO5A (LS Bio)、および Rab Family Antibody Sampler Kit (Cell Signaling Technology) を一次抗体として用いた後、Cy3 goat anti-rabbit IgG によって蛍光標識した。

4. 研究成果

(1) アクチン依存性の NTNHA 細胞内輸送

先の研究成果により、細胞内に侵入した NTNHA は、常にアクチンと共存していることが示されており (図 1)、NTNHA のアクチンに依存した細胞内輸送が示唆されていた。そこで本研究では、アクチン分子の重合を特異的に阻害するサイトカラシン B の存在下における NTNHA の細胞内輸送を観察した。その結果、図 2 に示した。サイトカラシン B の非存在下では、NTNHA 分子が各周辺に集中して存在している。一方、サイトカラシン B の濃度依存的に細胞内のアクチンフィラメントの構造が変化し、それに伴い、細胞内の NTNHA の存在部位が変化していることが示された。この結果は、細胞内のアクチンフィラメントは、NTNHA の細胞内侵入には影響しない一方で、細胞内の輸送に何らかの役割を担っていることを示している。

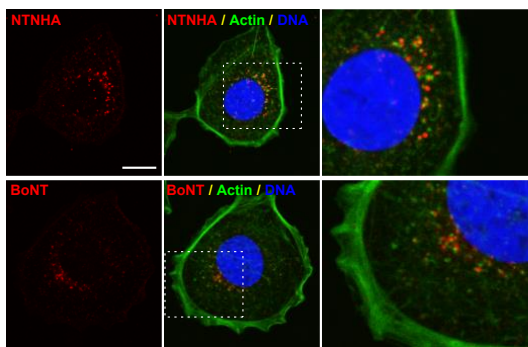


図 1 NTNHA の細胞内侵入

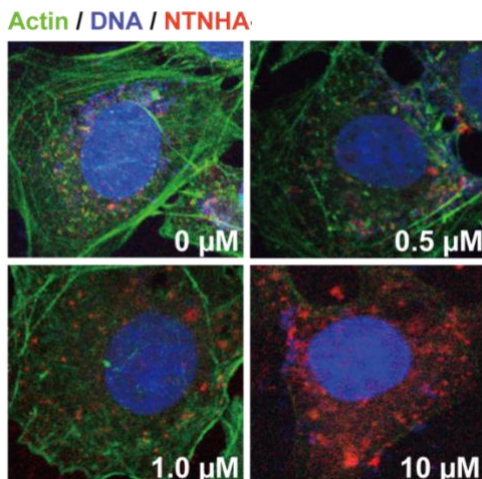


図 2 サイトカラシン B 存在下における NTNHA の細胞内侵入

(2) NTNHA 輸送における Myosin V の関与

Myosin V は、アクチンを基にした細胞質内の物質輸送に関与している。前項の結果は、NTNHA の輸送にアクチンが何らかの関与を示していた。本項では、NTNHA 輸送に対する Myosin V の関与を明らかにするため、NTNHA 侵入時において Myosin V が NTNHA と共局在するか否かを観察した。

図 3 は、IEC-6 内に NTNHA が侵入した際の NTNHA/Myosin V/アクチンの多重染色の

結果である。すなわち、細胞内において、3 者が共存していることが検出され、NTNHA の細胞内輸送には「アクチン-ミオシン」系が関与していることが示された。

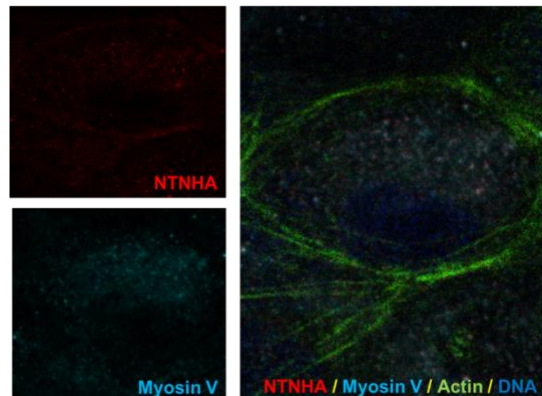


図 3 NTNHA の細胞内侵入におけるアクチン-ミオシン-NTNHA の共局在

(3) NTNHA 輸送に関わる小胞の同定

本項では、NTNHA の細胞内輸送に関わる細胞内小胞を明らかにするため、細胞内に侵入した NTNHA と細胞内の Rab タンパク質の局在性を調べた。本研究では、細胞内の Rab タンパク質のうち 5 種類 (Rab4、5、7、9 および 11) について着目し、それぞれの抗体を用いた蛍光免疫染色によって検出した。その結果、いずれの Rab タンパク質も NTNHA の侵入によって増加していることが明らかとなった。さらに、NTNHA 抗体と Rab 抗体を用いた二重蛍光免疫染色によるそれぞれのタンパク質の検出を行ったところ、いずれの Rab タンパク質も細胞内に侵入した NTNHA と共局在していることが示された (図 4)。

本研究で着目した Rab のうち、Rab4 は細胞膜上の各種受容体のリサイクリングに、Rab5 は初期エンドソームの形成、Rab7 および 9 は後期エンドソームからゴルジ体への輸送、Rab11 は、リサイクリングエンドソームから細胞膜への輸送に関与していることが示されている。すなわち、本研究の結果から、NTNHA が、細胞膜上の受容体リサイクルされる際に同時に細胞内に侵入し、初期エンドソーム、後期エンドソームを経て、ゴルジ体へと侵入し、再びリサイクリング経路を経て細胞外に排出される細胞内輸送モデルが示された。

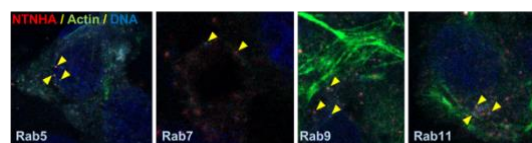


図 4 NTNHA の細胞内侵入における Rab-NTNHA の共局在

〈引用文献〉

① Inui K, Sagane Y, Miyata K et al., Toxic and nontoxic components of botulinum neurotoxin complex are evolved from a common ancestral zinc protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 419, 500-504

② Sagane Y, Miyashita S, Miyata K et al., Small-angle X-ray scattering reveals structural dynamics of the botulinum neurotoxin associating protein, nontoxic nonhemagglutinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 425, 256-260

③ Ito H, Sagane Y, Miyata K et al., HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Vol. 61, No. 3, 323-331

④ Miyashita S, Sagane Y, Niwa K, Watanabe T., Transport of the botulinum neurotoxin-associating protein, nontoxic nonhemagglutinin, across the rat small intestinal epithelial cell monolayer. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 346, No. 1, 73-80.

⑤ Miyashita S, Niwa K, Watanabe T, Sagane Y., Host-cell specificity and transcytosis of nontoxic nonhemagglutinin protein of botulinum neurotoxin serotype D. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 357, No. 2, 115-122.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Sagane, Y., Mutoh, S., Koizumi, R., Suzuki, T., Miyashita, S. -I., Miyata, K., Ohyama, T., Niwa, K., Watanabe, T. (2017). Reversible association of the hemagglutinin subcomplex, HA-33/HA-17 trimer, with the botulinum toxin complex. *Protein J.* 36, pp. 417-424. [査読あり]

② Suzuki, T., Sagane, Y., Matsumoto, T., Hasegawa, K., Yamano, A., Niwa, K., Watanabe, T. (2017). Building-block architecture of botulinum toxin complex: conformational changes provide insights into the hemagglutination ability of the complex. *Biochem. Biophys. Rep.* 9, pp. 67-71. [査読あり]

③ Sagane, Y., Ito, M., Miyata, K., Suzuki, T., Niwa, K., Oguri, S., Watanabe, T. (2016). Data describing inhibitory profiles of sugars against hemagglutination by the botulinum toxin complex of *Clostridium botulinum* serotypes C and D. *Data Brief* 9, pp. 413-416. [査読あり]

④ Sagane, Y., Hayashi, S., Akiyama, T., Matsumoto, T., Hasegawa, K., Yamano, A., Suzuki, T., Niwa, K., Watanabe, T., Yajima, S. (2016). Conformational divergence in the HA-33/HA-17 trimer of serotype C and D botulinum toxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476, pp. 280-285. [査読あり]

⑤ Miyashita, S. -I., Sagane, Y., Suzuki, T., Matsumoto, T., Niwa, K., Watanabe, T. (2015) "Non-Toxic" proteins of the botulinum toxin complex exert in-vivo toxicity. *Sci. Rep.* 6, pp. 31043. [査読あり]

⑥ Miyata, K., Suzuki, T., Hayashi, S., Miyashita, S. -I., Ohyama, T., Niwa, K., Watanabe, T., Sagane, Y. (2015). Hemagglutinin gene shuffling among *Clostridium botulinum* serotypes C and D yields distinct sugar recognition of the botulinum toxin complex. *FEMS Path. Dis.* 73, pp. ftv045 [査読あり]

[学会発表] (計 2 件)

① Sagane, Y., Miyashita, S. -I., Hosoya, K., Karatsu, S., Kurihara, A., Sugawara, C., Niwa, K., Watanabe, T. (2017). Internalization and intercellular trafficking of the serotype D botulinum neurotoxin binding protein, nontoxic nonhemagglutinin, in epithelial and endothelial cells. 10th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia. Ann Arbor, U. S. A.

② Sagane, Y., Miyashita, S. -I., Kurihara, A., Sugawara, C., Hosoya, K., Karatsu, S., Niwa, K., Watanabe, T. (2017). "Non-toxic" proteins of the botulinum toxin complex exert cytotoxicity with vacuole formation in the cell. 10th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia. Ann Arbor, U. S. A.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相根 義昌 (SAGANE, Yoshimasa)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号：00624660

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

丹羽 光一 (NIWA, Koichi)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号：20301012

武藤 信吾 (MUTOH, Shingo)
鎌倉女子大学・家政学部・講師
研究者番号：20749890

鈴木 智典 (SUZUKI, Tomonori)
東京農業大学・生命科学部・准教授
研究者番号：90453836

(4) 研究協力者

()