

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08476

研究課題名(和文) 多能性胚性癌細胞を用いたボツリヌス毒素の毒性発現に関わる宿主因子の解明

研究課題名(英文) Pluripotent embryonal carcinoma cells are available for identifying cellular targets responsible for botulinum neurotoxins

研究代表者

塚本 健太郎 (Tsukamoto, Kentaro)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：80434596

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)：ボツリヌスC型毒素は他の毒素型と比べて受容体結合の特異性や宿主特異性が異なり、特有の作用機構を有していると考えられる。最近我々が見いだした毒素感受性細胞株P19を用いて、ボツリヌスC型毒素の細胞内侵入機構と細胞内局在性を調べた結果、本毒素は、細胞表面上に存在するガングリオシドに結合後、クラスリンおよびカベオラ非依存的なエンドサイトーシス経路により細胞内に侵入することがわかった。また、エンドソームに取り込まれた後は、エンドソーム内の酸性化がその毒性発現に必須であることも明らかにした。P19細胞はC型に限らずボツリヌス毒素の細胞内動態解析を行う上で、有用な細胞株であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to prove the utility of P19 cells for the study of the intracellular mechanism of botulinum neurotoxins, ganglioside-knockout neurons were generated by deletion of ganglioside synthase in P19 cells using CRISPR/Cas9 system. The sensitivity of the generated ganglioside-knockout P19 neurons to botulinum neurotoxin type C was decreased considerably, and the exogenous addition of the gangliosides GD1a, GD1b, and GT1b restored the susceptibility of P19 cells to botulinum neurotoxin type C. Therefore, the genome-edited P19 cells generated by the CRISPR/Cas9 system were useful for identifying and defining the intracellular molecules involved in the toxic action of botulinum neurotoxins. Moreover, we evaluated the endocytotic pathway for the uptake of botulinum neurotoxin type C into P19 cells. Consequently, we conclude that BoNT/C could enter cultured neuron independent of both synaptic vesicle recycling and clathrin-mediated endocytosis.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス毒素 多能性胚性癌細胞 P19 ガングリオシド CRISPR/Cas9

### 1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス神経毒素はボツリヌス菌によって産生される蛋白毒素であり、その抗原性の違いから A から G 型に分類される。本毒素は極めて強い致死活性を有し、末梢神経に作用して弛緩性麻痺を引き起こす。ボツリヌス症では菌体から遊離した毒素のみによって病態が引き起こされることから、毒素の標的分子や受容体同定などの作用機構の解明が、発症メカニズムの解明に直接に繋がる。これまで、ボツリヌス毒素の受容体は二成分から成ると考えられてきた。すなわち、毒素型に共通の成分であるガングリオシドと毒素型に特異的な成分であるシナプス小胞膜蛋白質である。実際、A, B, E, F, G 型ではこの説を裏付ける受容体が同定されている。一方、我々は、C 型毒素がガングリオシドのみを認識し、小胞膜蛋白質に結合しないことを最近の研究で明らかにした。これは、C 型毒素が A, B, E, F, G 型毒素とは異なる細胞内侵入機構をもつ可能性を示しているが、その詳細は不明である。これらの未解決な問題を解消するためには、培養細胞を用いた実験が有効であるが、ボツリヌス毒素に対する感受性細胞はこれまで適当なものがなく、研究の進展に支障をきたしていた。この点を打開するため、我々は、マウス胚性癌細胞由来細胞株である P19 細胞が毒素に高感受性であることを見だし、ボツリヌス毒素の細胞レベルでの解析を容易にさせることを可能にした。本細胞は神経細胞や心筋細胞への分化可能な多能性細胞であるが、特に神経に分化しやすく、また遺伝子導入やノックアウト細胞の樹立も初代培養神経細胞に比べて効率よく行えるため、ボツリヌス毒素の作用過程に関わる細胞側因子の解析に非常に有用である。

### 2. 研究の目的

本研究では、A 型や B 型毒素に比べて作用機序に未解明の部分が多い C 型毒素を主な研究対象とした。P19 細胞の標的遺伝子を改変して毒性発現に関わる宿主因子の同定と機能解析を行い、毒素の細胞認識から細胞内侵入機構、および型間の差異を明確にすることを目的とする。ボツリヌス毒素は神経の興奮刺激依存的に取り込まれて作用すると考えられているが、C 型毒素は刺激非依存的な独自の細胞侵入機構を持つ可能性がある。そこで、C 型毒素の細胞認識時のガングリオシドの役割、およびその後の細胞内侵入過程におけるエンドサイトーシス経路について解析を進めた。

### 3. 研究の方法

(1) ボツリヌス毒素および受容体結合領域のリコンビナント蛋白：ボツリヌス C 型神経毒素 (BoNT/C) はボツリヌス C 型菌 CB-19 株から神経毒素を精製して用いた。BoNT/C の受容体結合領域である H<sub>c</sub>/C は大腸菌で発現させたリコンビナント蛋白を用いた。細胞内の

局在解析に用いる H<sub>c</sub> は Alexa Fluor®488 もしくは Alexa Fluor 568 で蛍光標識した。

(2) P19 細胞：マウス胚性癌細胞由来細胞株 P19 細胞はレチノイン酸で 4 日間処理することで、神経細胞に分化させて用いた。また、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、ガングリオシド合成酵素の一つである *b4galnt-1* 遺伝子をノックアウトした P19-GKO 細胞を作製した。

(3) BoNT/C の細胞侵入経路の解析：種々のエンドサイトーシス阻害剤で P19 細胞を処理した後、BoNT/C を 30 分間作用させ、洗浄および培地交換し、さらに 20 時間インキュベートした後に細胞を回収した。回収した細胞を溶解し、BoNT/C の細胞内標的蛋白である SNAP-25 の切断量を Western blotting により確認することで、細胞内への取り込みを評価した。

(4) BoNT/C の細胞内局在の解析：P19 細胞内の初期エンドソーム、後期エンドソーム、シナプス小胞を CellLight 試薬を用いて標識後、蛍光標識 H<sub>c</sub>/C を 30 分間取り込ませた。洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また、ボツリヌス A 型神経毒素 (BoNT/A) との局在性の違いを調べるため、蛍光標識した H<sub>c</sub>/A との共局在性についても調べた。

### 4. 研究成果

(1) BoNT/C はガングリオシド依存的に細胞内に侵入する：P19 細胞に BoNT/C を作用させると、標的蛋白である SNAP-25 が切断されるが、ガングリオシド合成酵素をコードする *b4galnt-1* 遺伝子をノックアウトした P19-GKO 細胞では SNAP-25 の切断が抑制された (図 1)。また、BoNT/C のガングリオシド結合能を欠失させた変異体 H<sub>c</sub>/C-W1257A は P19 細胞にほとんど取り込まれなかった。これらのことから、BoNT/C の細胞への取り込みには、ガングリオシドへの結合が必須であるとわかった。

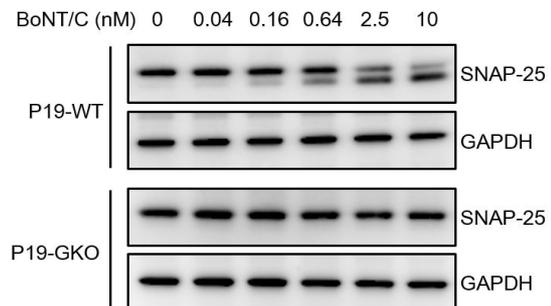


図1. P19-GKO細胞のBoNT/Cに対する感受性

P19-WT細胞では、SNAP-25の切断がBoNT/C濃度依存的に見られたが、P19-GKO細胞ではSNAP-25は切断されなかった。

(2) BoNT/C の細胞侵入経路はダイナミン、クラスリンおよびカベオラ非依存的である：

エンドサイトーシスの際に細胞膜から小胞の切り離しを触媒する GTPase であるダイナミンを阻害する Dyngo-4a を P19 細胞に作用させたが、高濃度(100  $\mu$ M)でも SNAP-25 の切断抑制は認められなかった。また同様に、クラスリン経路の阻害剤である PitStop-2 あるいはカベオラ依存性エンドサイトーシスを阻害する Filipin、M CD でも BoNT/C による SNAP-25 の切断は抑制されなかった(図2)。

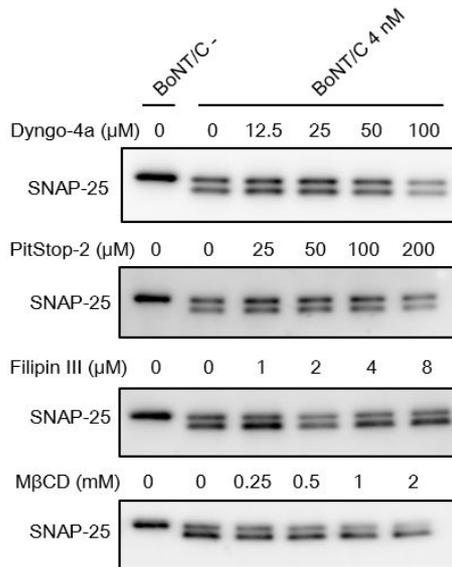


図2. BoNT/Cの細胞内活性に対するエンドサイトーシス阻害剤の影響  
いずれのエンドサイトーシス阻害剤で処理しても、BoNT/Cの細胞内活性に影響しなかった。

(3) BoNT/C の細胞侵入にはマクロピノサイトーシスは関与しない：マクロピノサイトーシスは細胞膜周辺のアクチンフィラメントが重合することで、細胞外に膜が隆起し、高分子などを取り込む機構であり、phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)が必須とされている。そこでアクチン重合阻害剤である Cytochalasin D (CytD) あるいは PI3K 阻害剤である Wortmannin を P19 細胞に処理したが、BoNT/C による SNAP-25 の切断は抑制されなかった(図3)。

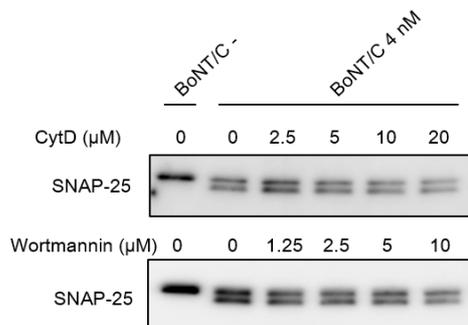


図3. BoNT/Cの細胞内活性に対するマクロピノサイトーシス阻害剤の影響  
いずれのマクロピノサイトーシス阻害剤で処理しても、BoNT/Cの細胞内活性に影響しなかった。

(4) BoNT/C の活性発現にはエンドソームの酸性化が必須である：いずれのエンドサイトーシス阻害剤においても BoNT/C の取り込みが阻害されなかったため、エンドソーム内の酸性化を阻害する Bafilomycin A1 (BafA1) によって P19 細胞を処理し、BoNT/C の活性を調べた。その結果、BoNT/C による SNAP-25 の切断は BafA1 処理により濃度依存的に抑制された(図4)。

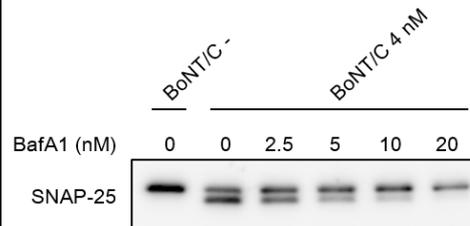


図4. BoNT/Cの細胞内活性に対するBafA1の影響  
BoNT/CのSNAP-25の切断はBafA1処理により濃度依存的に抑制された。

(5) BoNT/C の細胞内局在：H<sub>c</sub>/C と初期エンドソーム、後期エンドソーム、シナプス小胞の共局在性を調べた結果、H<sub>c</sub>/C はいずれのオルガネラとも一部共局在が見られたものの、ほとんどの蛍光シグナルは異なる局在性を示した。また、H<sub>c</sub>/C は H<sub>c</sub>/A と共局在が見られたが、一方で共局在しないシグナルも認められた。

#### 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1件)

Tsukamoto K, Ozeki C, Kohda T, Tsuji T. CRISPR/Cas9-mediated genomic deletion of the beta-1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase 1 gene in murine P19 embryonal carcinoma cells results in low sensitivity to botulinum neurotoxin type C. *PLoS One* 2015; 10 (7): e0132363. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

(1) 幸田 知子, 塚本 健太郎, 小崎 俊司, 向本 雅郁. 変異型ボツリヌス A 型毒素に対する神経細胞の感受性は毒素重鎖 N 末端ドメインに依存する. 2017 年 3 月 19-20 日. 第 90 回日本細菌学会総会, 宮城県仙台市

(2) 塚本 健太郎, 幸田 知子, 辻 孝雄. ボツリヌス C 型神経毒素の細胞侵入経路と局在解析. 第 63 回トキシシンポジウム. 2016 年 7 月 16 日. 山形県天童市

(3) 塚本 健太郎, 幸田 知子, 辻 孝雄. ボツリヌス C 型毒素はクラスリン非依存的エンドサイトーシスにより神経細胞内に侵入する. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 24 日. 大阪市

(4) 塚本 健太郎, 幸田 知子, 辻 孝雄. ボツリヌスC型毒素の細胞内侵入に関わるエンドサイトーシス経路の解析. 第52回日本細菌学会中部支部総会. 2015年10月24日. 愛知県名古屋市

(5) 塚本 健太郎, 辻 孝雄. ボツリヌスC型毒素に対する Bafilomycin A1 の阻害効果について. 2015年10月1日. 第47回藤田学園医学会. 愛知県豊明市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚本 健太郎 (TSUKAMOTO KENTARO)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：80434596

### (2) 研究分担者

幸田 知子 (KOHDA TOMOKO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：80336809