

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05469

研究課題名（和文）クロストリジウム細菌生産毒素の分子認識機構の解明

研究課題名（英文）Molecular structure-based study on the affinity of Clostridium producing toxins to human cell surface glycolipids

研究代表者

鷗沢 浩隆（UZAWA, Hirotaka）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：60356566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：クロストリジウム属の細菌が生産するボツリヌス毒素（BTX）と糖脂質との結合相互作用を解析するため、糖還元部位にアンカーを有する人工糖脂質をケモエンザイム法により合成した。水晶振動子電極の金薄膜に合成糖脂質を固定化し解析チップを開発した。差動型水晶振動子マイクロバランス（QCM）による相互作用解析を行い、合成糖脂質とBTXとの結合を検証した。その結果、従来の報告では結合しないとされた合成糖脂質に対して強く結合することを明らかにした。又、これまで未検討であった合成糖脂質に対して、BTXが結合することを初めて明らかにするなど、これまでに報告例のない学術的に重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボツリヌス毒素（BTX）は、神経細胞に存在する糖脂質に結合して致命的な中毒症状を示すタンパク質性生物毒素である。従来の報告では、糖脂質GT1bにBTX/Aが結合するが、生理学的条件下では結合しない等相反する結果が報告されている。これは、古典的な結合評価法が用いられている事、統一された手法で解析されていない事や組成の異なるBTXが用いられた事による。本研究では、単一分子量のBTXを用い、先端のセンシング技術により再評価することで、報告例のない結合相互作用を解明する等、学術的新規性を見出した。得られた知見を高感度毒素検知法の開発に適用する事で、生物化学剤による犯罪防止に有効に資すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Synthetic glycolipids having liponic amides at the sphingosine parts were prepared by a chemo-enzymatic method. The glycolipids were installed onto Au surface on electrodes by a self-assembled monolayer (SAM) technique in a differential quartz crystal microbalance (QCM) biosensor for application in the binding analysis of Clostridium toxins (BTXs). The QCM analysis has disclosed that a certain type of BTXs binds a simple glycolipid (Lac-Cer) without sialic acids at the non-reducing end. This finding provides an important insight into the molecular recognition of these biological toxins for human cell surface glycolipids which has been a matter of controversy in relevant biochemical studies for a long time.

研究分野：糖鎖合成、バイオセンサ

キーワード：糖脂質 合成 ガングリオシド 検知チップ 相互作用解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで、食中毒の原因となる大腸菌 O157 ペロ毒素やコレラ毒素、犯罪・テロに使用された猛毒リシンについて、超高感度に迅速に検出するバイオセンサの開発を行ってきた。これらの研究では、毒素が細胞表層に存在する特定の糖鎖に結合することに着目し、他に先駆けて糖鎖を用いた毒素検出技術を開発した。本技術は、プラズモン光、金ナノ粒子(ナノマテリアル)、マイクロ流路を用いた融合的な先端的研究である。研究代表者は、これまでの実績をクロストリジウム細菌生産毒素(BTX)に応用しようと考えた。BTXは、糖脂質に結合すると考えられているからである。しかし、詳細に文献を調べてみると、BTXの真のリガンドがどのような構造の糖脂質であるのか不明であり、また、相反する結論が導き出されていることを突き止めた。研究代表者は、先端センシング技術を用いて、統一的手法による再評価を行い、単一分子量のBTXと糖鎖の結合相互作用を解析し、この学術的矛盾を解決できると考え提案に至った。

2. 研究の目的

Clostridium 細菌生産毒素(BTX)は、食中毒の原因毒素である。神経細胞に存在するガングリオシドとよばれる高度にシアル酸化した糖脂質に結合して中毒症状を示す。ガングリオシドには多種類の異性体や類縁体が存在し、BTX (types A-F)との結合に関与していると考えられている。従来報告では、GT1bはBTX/Aに結合する一方、生理学的条件下では結合しないという報告がある。又、GT1bはBTX/Cに結合するという報告の他に、結合しないという報告もある。GD1aは、BTX/C、BTX/Dと結合するという報告と、結合しないという報告がある。又、GD1aは、BTX/Aと結合するという報告があるが、ヘマグルチニン(HA)を有する複合体BTX/A (progenitor)は結合しないという報告がある。GM1は、BTX/C及びBTX/Dに結合するという報告と、結合しないという報告がある。又、GM1は、BTX/Aに結合しないという報告と、非常に弱いながらも結合するという報告がある。このように相反する多くの矛盾がある。その主な理由は、BTXと糖脂質との結合評価法が、免疫沈降法、TLC発色法、毒素不活化法、ELISA法、蛍光法、細胞毒性試験など多岐にわたり、同一の分析法で評価されることがなかったためである。また、BTXは培養条件により、分子量が900kDa~150kDaの混合物として分泌される。150kDaの毒素は、BTXの最小単位であり、ガングリオシド結合活性を有する。900kDa~300kDaの分子量の毒素は、最小単位の神経毒素150kDaにHAや毒性のない蛋白質(non-toxic non-hemagglutinin: NTNHという)が付加した複合体であり、HAそれ自身も糖脂質への結合活性を有する。そのため、ガングリオシドへのBTXの結合は複雑多岐にわたり、分析に使用したBTXの組成に応じて、矛盾した結果が導かれたと推察される。本研究では、単一分子量のBTXを用い、最先端のセンシング技術を用い、BTXと糖脂質の結合を分子レベルで再評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 結合相互作用解析のための人工糖脂質の合成

クロストリジウム細菌生産毒素(BTX)と糖脂質との結合相互作用を解析するには、糖脂質をセンサチップ金薄膜に固定化する必要がある。そこで、糖還元末端側スフィンゴシン部位にジスルフィド結合を有するリポ酸を導入した人工糖脂質リガンドを設計した。

天然ガングリオシドGT1b、GT1a、GD1b、GM1、GM3(植物型)について、酵素SCDaseを作用させ、2本鎖セラミドのアミド結合について選択的加水分解を行い、アミノ基遊離のlysoGT1b、lysoGT1a、lysoGD1b、lysoGM1、lysoGM3を合成した。次に、DMF中、NHS活性化リポ酸と反応させ、ジスルフィド結合を有するアンカーを導入し、GT1b-TOA、GT1a-TOA、GD1b-TOA、GM1-TOA、GM3-TOA(植物型)を合成した(TOA:リポ酸)。Gb₃、Lac、Gal、Glcについては、これらのセラミド体について塩基性条件下で加水分解を行い、対応するlyso体に変換後、あるいは、市販のlyso体を原料に用いてアンカーを導入した。即ち、これらのlyso体について、DMF中NHS活性化リポ酸と反応させ、Gb₃-TOA、Lac-TOA、Gal-TOA、Glc-TOAを合成した。

(2) 相互作用解析のための糖脂質固定化チップの開発

次に、合成した各種糖脂質リガンドを水晶振動子電極の金薄膜に固定化し、解析チップを開発した。自己集積化膜(SAM)法によりサンプル側に各種糖脂質リガンド(GT1b-TOA、GM1-TOA、Lac-TOA、Glc-TOA)を、レファレンス側にMPEG₄又はHOEG₆C₁₁SHを固定化した。測定環境下のノイズを可能な限りリアルタイムに低減もしくは相殺するため、レファレンス側に非特異的吸着を生じさせないと期待されるリガンドを用いた。

(3) 差動型水晶振動子マイクロバランス(QCM)による相互作用解析

差動型水晶振動子マイクロバランス(QCM)を用いて、BTXと合成糖脂質との相互作用解析を行った。評価には30MHz QCMを用い、絶対量として250ngのBTXを用いた(BTX/Eは200ng、BTX/C

のうち、Glc-TOAのみ200ng)。ランニング緩衝液には、生理的条件下の150mM NaClを含む10mM HEPES(pH7.4)を用いた。BTXには、BTX/A、BTX/C、BTX/E、及び、BTX/A/Hc(組換え体)を用いた。BTX/A/Hcには、安定剤が含まれているので遠心限外ろ過により除去後、試料に供した。これらの実験は、感染症法、及び、関連法令に基づき物理的拡散防止措置を講じたうえで安全に実施した。

4. 研究成果

(1) 差動型 QCM の検証

差動型 QCM は、測定下の微小なノイズをリアルタイムに除去することができる。はじめに、毒素と糖脂質との結合相互作用を解析するための差動型 QCM の有効性を検証した。糖脂質に Lac-TOA を、リファレンスリガンドに、MTPEG₄、及び、HOEG₆C₁₁SH をチップ(金電極)に固定化し、RCA₁₂₀(*Ricinus communis* agglutinin)の100ngを作用させた時の周波数減少(ΔF)を比較した。その結果、MTPEG₄では128Hz、HOEG₆C₁₁SHでは125Hzの周波数減少が見られ、リファレンス側リガンドにおいて両者に大きな差はなかった。又、RCA₁₂₀は、Lacに対して大きな結合を示し、本評価法が糖脂質と毒素の結合解析に有用であることがわかった。

(2) 各種糖脂質と BTX の結合評価

GT1b-TOA 及び HOEG₆C₁₁SH をそれぞれ固定化したチップを用い、単一分子量を示す実剤 BTX/A(500kDa)、BTX/C(350kDa)、BTX/E(300kDa)、BTX/A/Hc(51kDa)について結合評価を行った。BTX/A/Hcについては、遺伝子組換え体であり、タンパク純度は高く、先述した HA 及び NTNH 等の複合体は含まれていないが、安定剤として過剰のラクトースが含まれている。本研究では、このラクトース添加の有無が結合に与える影響についても調べた。30MHz QCM において各毒素を注入した時に、BTX/Aでは28Hz、BTX/Cでは140Hz、BTX/Eでは14.1Hzといずれも周波数減少が見られた。ラクトース含有 BTX/A/Hcでは5Hzに留まったが、ラクトースを含まない BTX/A/Hcでは104Hzと大きな ΔF を示した。

GM1-TOA 固定化チップでは、BTX/A、BTX/A/Hc(ラクトース含有)、BTX/A/Hc(ラクトース含まず)において、いずれも、明確な ΔF を示さなかった。一方、BTX/Cでは112Hz、BTX/Eでは34Hzの明確な周波数減少が見られた。

Lac-TOA 固定化チップでは、BTX/Aにおいて105Hzの大きな周波数減少があった。BTX/A/Hc(ラクトース含有)では周波数減少は見られず、一方、BTX/A/Hc(ラクトース含まず)では、87.5Hzの大きな ΔF が見られた。BTX/A/Hc(ラクトース含有)は、ラクトースを過剰に含むため、ラクトースが阻害剤として機能し、Lac-TOAチップにBTX/A/Hcが結合できなかったことを意味する。BTX/Cでは、20.9Hz、又、BTX/Eでは、10.6Hzの ΔF があった。

Glc-TOA 固定化チップにおいては、BTX/Aで15Hz、BTX/Cで29.2Hz、BTX/Eで3.1Hzの周波数減少が見られた。BTX/A/Hc(ラクトース含有)では7.3Hz、BTX/A/Hc(ラクトース含まず)ではこれよりも大きな28.4Hzの ΔF が観測された。

(3) 本結果の考察

以上より、GT1b-TOA ではいずれの毒素も結合し、従来の報告通りの結果となった。毒素の型により結合に差があり、BTX/C>BTX/A/Hc>BTX/A>BTX/Eの順となり、定量的にGT1bに対する結合量の差を明らかにできた。これは従来の報告にない新しい知見である。GM1-TOA では、BTX/A、BTX/A/Hcは結合しなかった。この結果は、従来の多くの報告と一致している。BTX/Cは、GM1に結合する、結合しないという報告があるが、本結果においては結合した。BTX/Eは、これまでの報告において結合しないとされた5糖GM1に対して結合した。本研究で用いたBTX/Cの分子量は350kDaであり、又、BTX/Eの分子量は300kDaであることから、いずれもヘマグルチニン(HA)活性を有するタンパク質は付加していないため、神経毒素重鎖(Hc)部分においてGM1が結合したと示唆された。これまで報告されていない興味深い知見を得た。

Lacに対する結合では、これまでの報告において、HA活性を有するBTX/A(progenitor toxin)がLacに弱く結合するという報告が1報あるのみで、Lacに対する結合は不明な点が多い。本結果では、BTX/AはLac-Cerに対する周波数減少が大きく、相当量の当該毒素が結合している。本研究で用いたBTX/Aは、HAが付加した複合体であることから、HA部位がLacに結合した可能性もある。一方、HAを持たないBTX/A/Hcにおいて、Lacに対して87.5Hzと大きな周波数減少が観測されたことから、重鎖HcはLacを明らかに認識して結合していると言える。本成果は、従来報告されていない、BTX/A/Hcの糖結合部位がLacを認識して結合するという新しい知見である。

これまでのところ、Lacに対するBTX/Eの結合についての報告例はない。本結果は、BTX/EがLacに対しても弱いながらも明確に結合したことを示す最初の知見である。一方、BTX/CはLacに結合しないという報告があるが、本結果では、Lacに結合した。Glcに対しては、BTX/A、BTX/Cは結合しないという報告が数例あるが、Glcに対する結合を調べた例はもともと少なく、不明な点が多い。本結果では、BTX/A、BTX/A/Hc、BTX/C、BTX/Eのいずれも結合した結果を示した。HA活性を持たないBTX/A/Hcが、単純なGlcにおいてさえ、明確に結合を示したことから、重鎖糖結合部位がGlcを認識して結合したことは間違いない。この成果は、これまで報告されておらず、貴重な興味ある知見である。

以上より、単一分子量の BTX、及び、HA 活性を持たない BTX/A/Hc を用い、QCM という同一の評価法にて、各種糖脂質に対する結合を定量的に評価した。その結果、従来報告では結合しないとされた合成糖脂質に対して強く結合することを明らかにするなど、これまで得られなかった貴重な成果を上げることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uzawa Hiroataka, Nagatsuka Takehiro, Seto Yasuo, Nishida Yoshihiro, Saito Masato, Tamiya Eiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel Glycolipid Chips with a Double Layer of Au Nanoparticles for Biological Toxin Detection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 13754 ~ 13762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.2c07976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uzawa Hiroataka, Kondo Satoshi, Nagatsuka Takehiro, Miyaguchi Hajime, Seto Yasuo, Oshita Aguri, Dohi Hirofumi, Nishida Yoshihiro, Saito Masato, Tamiya Eiichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Assembly of Glycochips with Mammalian GSLs Mimetics toward the On-site Detection of Biological Toxins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 32597 ~ 32606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c04154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Daiki Tanaka, Hiroataka Uzawa, Takehiro Nagatsuka, Yuki Oba, Atsunori Hiratsuka, Ken-ichi Tayama, Toshio Yoshida, Yasuo Seto, Hirofumi Dohi, Yoshihiro Nishida	4. 巻 580
2. 論文標題 Silicon nitride sugar chips for detection of Ricinus communis proteins and Escherichia coli O157 Shiga toxins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 42 ~ 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2019.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroataka Uzawa, Atsunori Hiratsuka, Yasuo Seto, Ken-ichi Tayama, Toshio Yoshida, Yoshihiro Nishida
2. 発表標題 Silicon Nitride Chips Modified with Gb3 Trisaccharide for Rapid Detection of Verotoxins
3. 学会等名 10th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE10) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鵜沢浩隆、平塚淳典
2. 発表標題 ケモエンザイム法による糖脂質ライブラリーの構築
3. 学会等名 第18回 産総研・産技連 LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 非特異的吸着抑制効果の高い糖鎖リガンド、および該糖鎖リガンドを固定化した毒素検知チップ	発明者 鵜沢浩隆	権利者 国立研究開発法人 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-071741	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平塚 淳典 (Hiratsuka Atsunori) (70392652)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・副部門長 (82626)	削除：2020年6月5日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------