

令和 5 年 3 月 2 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07123

研究課題名(和文)新規に見出されたボツリヌス毒素複合体の細胞認識における「機能シフト機構」の解明

研究課題名(英文) Novel "Functional shift" in Cell-Recognition found in Botulinum Neurotoxin Complex

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス菌が産生する毒素複合体(TC)は、その構成成分の1つであるHA-33の細胞認識機能により小腸上皮細胞の特定の糖鎖に結合し、上皮組織を透過することで体内に侵入するものと考えられる。本研究では、ボツリヌスC型菌Yoichi株の産生するTCの構成成分HA-33が培養中に分子内切断による構造変化を起こし、細胞認識機能に変化が生じることを明らかにした。さらにHA-33タンパク質のN末端およびC末端に特定のタグタンパク質を導入した組換えタンパク質を調製し、一次構造変化に関与するタンパク質分解酵素の推定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ヒトに対するボツリヌス食中毒は大幅に減少した一方で家畜に対するボツリヌス中毒は、世界各地で散発しており一度に多額の被害を与えることがある。ひとたびボツリヌス中毒に罹患すると筋肉麻痺等が長期間に渡って起こることが知られている。ボツリヌス中毒における神経毒性については多くの研究が行われているが、どのようなメカニズムで毒素が体内に侵入するのかについては不明な点が多い。本研究の成果は、ボツリヌス毒素が体内に侵入するメカニズムの解明の一端を示すものであり、ボツリヌス中毒の予防や治療、さらに毒素の体内侵入メカニズムを応用した薬剤送達システムの開発に重要な知見となるものである。

研究成果の概要(英文)：Toxin complex (TC) produced by *Clostridium botulinum* binds to specific sugar chains on small intestinal epithelial cells through the cell recognition function of HA-33, one of constituents of the TC, and permeates the epithelial tissue into the body. In this study, we found that a structural shift was occurred in the HA-33 protein, a component of TC produced by C. botulinum serotype C strain Yoichi, due to intramolecular cleavage during culture of the strain, resulting in changes in cell recognition function. Furthermore, a recombinant protein in which a specific tag protein was introduced into the N- and C-terminal of the HA-33 protein was prepared, and the proteolytic enzyme involved in the primary structural change was estimated.

研究分野：タンパク質化学

キーワード：ボツリヌス毒素複合体 タンパク質分解酵素 血球凝集素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、NTNHA および 3 種の HA タンパク質 (HA-33、HA-17、HA-70) など無毒タンパク質と結合し、ボツリヌス毒素複合体 (TC) を形成する。ボツリヌス食中毒において、BoNT は汚染された食物と一緒に摂取され、胃や腸などの消化管を輸送されるが、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、小腸へ到達する。

BoNT は、単独でも小腸壁を透過し、体内に侵入することが知られている。しかし、2011 年、研究代表者らは、ラット小腸上皮株化細胞 (IEC-6) を用いた実験から、TC 分子内の HA-33 タンパク質の数に応じて、TC の細胞層透過が顕著に促進されることを明らかにした (Ito et al., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2011)。すなわち、HA-33 タンパク質は、TC が小腸壁を通過し体内に侵入する際に重要な役割を担うことが示唆された。さらに、ボツリヌス TC および HA-33 の細胞への結合や細胞層透過は、特定の糖の添加あるいは細胞表面の糖鎖を除去することで阻害されることから、HA-33 が特定の糖鎖との結合を介して細胞を認識し、標的とすることで体内への侵入を促進しているものと考えられる (Miyata et al., *FEMS Path. Dis.*, 2015; Sagane et al., *Data in Brief*, 2016)。

HA-33 の糖鎖への結合特異性は、付随する BoNT の血清型に依存し、A および B 型はガラクトース末端を持つ糖鎖に結合する HA-33 (HA-33_{Gal})、C および D 型 HA-33 はシアル酸末端を持つ糖鎖に結合する HA-33 (HA-33_{Neu5Ac}) をそれぞれ産生すると考えられていた。しかし、2015 年、研究代表者らは、C 型菌 Yoichi 株 (C-Yoichi) など、C および D 型菌株にもガラクトース認識型である HA-33_{Gal} を産生するものが存在することを初めて明らかにした (Miyata et al., *FEMS Path. Dis.*, 2015)。さらに、研究代表者らは、C-Yoichi の産生する HA-33 の糖鎖結合特異性は、翻訳後修飾によって HA-33_{Neu5Ac} から HA-33_{Gal} へと、その「構造」と「機能」がシフトしていることを見出した。機能シフト株 (C-Yoichi) の HA-33 分子の C 末端側は、他の HA-33 と比較し、アミノ酸の変異が多いことから、翻訳後修飾の影響を受けやすい構造を持つものと推測される。しかし、この「構造シフト」による「機能シフト機構」はその多くが不明のままである。また、研究代表者らは 2016 年、TC が IEC-6 に対し、空胞形成を伴う細胞毒性を有することを見出し (Miyashita et al., *Sci. Rep.*, 2016) ボツリヌス TC が、神経毒素としての機能だけでなく、消化管細胞への細胞毒性を有することを明らかにした。このことから、HA の「機能シフト」が、細胞毒性など、TC 全体の細胞生理活性に影響することが推測されるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究課題は、一部のボツリヌス菌機能シフト株が産生する TC に見出された HA-33 の「構造シフト」による「機能シフト機構」を解明することを目的としている。今までのボツリヌス TC に関する研究では、HA を介したボツリヌス TC の細胞認識機構は、先天的に限定され、不変のものであると考えられていた。しかし、我々が見出した機能シフト株が産生する TC では、HA-33 分子に特有の「構造シフト」が生じ、その結果、認識糖鎖をシフトさせ、ひいては TC のドラスティックな「機能シフト」に発展することが示唆されており、極めて独創的な研究成果を基盤としている。また、ボツリヌス毒素研究の多くが、毒性成分である BoNT に関するものであるが、本研究の対象は、毒素を運搬する役割を担う無毒タンパク質であり、この点においても独自性を持つ研究である。

さらに、本研究の成果は、ボツリヌス食中毒の発症メカニズム解明に有用であるだけでなく、毒素の運搬システムを利用した新規の経口ドラッグデリバリーシステムの開発への応用が期待される。また、近年の研究では、細胞のガン化と細胞表面の糖鎖組成異常との関連性が指摘されており (宮城, 化学と生物, 2014) 糖鎖認識に多様性を示す機能シフト株由来 TC の性質と特定の細胞を標的とした細胞毒性を利用した細胞診断や細胞レベルでのガン治療などへの応用が期待される極めて創造性に富んだ研究である。

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 C 型菌 Yoichi 株 (C-Yoichi) 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) 血球凝集活性の測定

血球凝集活性の測定は、96 穴マイクロウェルプレートを用いたマイクロタイター法によって行った。150 μ l/ml に調整された試料液 35 μ l は、150mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で連続 2 倍希釈された。そこに 35 μ l の 1% 馬血球浮遊液を加え、よく混合した。その後、室温で 2 時間静置し、凝集が確認された希釈倍率を記録した。

(3) SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli らの方法に従った。分離したタンパク質は、Coomassie Brilliant Blue により染色した。分子量マーカーとして、Phosphorylase b(97kDa)、Bovine serum albumin(BSA; 67kDa)、Egg ovalbumin(45kDa)、Carbonic anhydrase(30kDa)、Soybean trypsin inhibitor(20.1kDa)および α -Lactalbumin(14.4kDa)を用いた。

(4) 組換タンパク質の発現および精製

大腸菌 DH5 α 株へ形質転換した各種 HA-33 発現形質転換体を 100 μ g/ml Ampicillin を含む 10ml の LB 培地で 200rpm、37°C で 18 時間振とう培養した。1000ml の LB 培地が入った 2 l 容 baffled 型三角フラスコに培養した菌体を入れ、200rpm、37°C で O.D.600 が約 0.5 に達するまで振とう培養した。Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)を終濃度 0.4mM になるように添加し、200rpm、18°C、18 時間振とう培養した。培養液を遠心分離(10,000G、4°C、20 分)し、菌体を -80°C で凍結した。凍結菌体を 37°C で 30 分間融解し、0.3M NaCl を含む 50mM Phosphate buffer(pH 7.4)を加え懸濁し、超音波破碎した。破碎液を遠心分離(10,000G、4°C、20 分)し、上清を可溶性画分とした。各種 HA-33 の精製は、Profinity IMAC Ni-charged Resin アフィニティーカラム、HiLoad 16/60 Superdex 200pg ゲルろ過カラムおよび Mono S HR 5/5 陽イオン交換カラムにより行った。

4. 研究成果

(1) C-Yoichi 株培養液中での HA-33 タンパク質の切断と血球凝集活性の変化

ボツリヌス C-Yoichi 株を透析培養により 3 日間あるいは 5 日間培養し、それぞれの培養液から TC を粗精製した。得られた TC 画分を SDS-PAGE に供したところ、5 日間培養から得られた TC 中の HA-33 タンパク質は 30kDa のタンパク質バンドとして現れた。すなわち、既報の通り、5 日間培養では、HA-33 は C 末端の一部が欠落していることが示された。一方、3 日間培養から得られた TC 中の HA-33 は、33kDa および 30kDa の 2 本のタンパク質バンドとして出現した。このことから、3 日間培養では、HA-33 の C 末端が欠落したものと欠落していないものを含む TC が混在していることが示された。一方、得られた画分の血球凝集活性を比較したところ、5 日間培養から得られた TC は活性を示さなかったが、3 日間培養から得られた TC 画分は、血球凝集活性を示した。以上のことから、C-Yoichi が産生する TC は、産生された当初から HA-33 の C 末端が欠落しているのではなく、培養時間によって、徐々にアミノ酸の欠落が起こり、それに伴い、細胞との結合活性が変化していくことが示された。すなわち、C-Yoichi 株は、生育の初期と後期において、細胞への結合能が変化していることが示された。

(2) 組換タンパク質による C 末端が欠落した HA-33 タンパク質の調製

既報では、C-Yoichi が産生する TC を構成する HA-33 タンパク質は C 末端の 31 残基が欠落していることが明らかとなっている。本研究では、C-Yoichi HA-33 をコードする遺伝子に HA-33 の C 末端から 31 残基目のアミノ酸を終止コドンに変更した遺伝子 (ctHA-33) を発現用プラスミドに導入し、大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。大腸菌を超音波破碎した後、その上澄み液および沈殿をウェスタンブロット解析した結果、沈殿に多くの発現タンパク質が含まれていた。C 末端が欠落しないオリジナルの遺伝子を導入した系では、上澄み液にタンパク質が見られることから、C 末端領域がタンパク質の正常な可溶性に不可欠であることが推測された。以上の結果から、C 末端が欠落した HA-33 を組換タンパク質として発現させることを断念し、次の実験を行った。

(3) プロテアーゼによる分子内切断の検出を目的とした各種組換 HA-33 タンパク質の構築

本実験では、HA-33 タンパク質の N 末端領域および C 末端領域の欠落を容易に検出できるように C-Yoichi HA-33 遺伝子を鋳型とし、FLAG tag を C 末端に、HA tag を N 末端に融合した HA-HA33-FRAG 遺伝子を構築した。前項と同様の手法で組換タンパク質を調製した結果、可溶画分に目的のタンパク質が検出され、その発現に成功した。これにより、プロテアーゼによる HA-33 タンパク質の分子内切断の様子を簡便に観察することが可能になった。

(4) 大腸菌発現系による HA-33/HA-17 複合体の構築

ボツリヌス TC 中において、HA-33 は、1 分子の HA-17 に 2 分子の HA-33 が結合した HA-33/HA-17 複合体として存在し、HA-17 が HA-70 に結合する形で HA-33 が TC 表面に露出している。したがって、HA-33 の分子内切断位置を再現するためには、複合体構造を持っている必要があると考えられる。そこで、本実験では、HA-33 と HA-17 を共発現する系を構築した。その結果、C-Yoichi 由来 HA-33 と HA-17 の複合体を構築することに成功した。これまでに、C-Yoichi 菌株からは、C 末端が欠落した HA-33 を含む複合体しか得ることができなかったため、これにより C 末端が欠落した HA-33 あるいは欠落していない HA-33 を含む複合体をそれぞれ得ることができ、さらに、それらと比較することができるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shin-Ichiro Miyashita, Yoshimasa Sagane, Takamasa Uchino, Shura Karatsu, Keita Hosoya, Ihsun Huang, Koichi Niwa, Toshihiro Watanabe, Yoichi Niimura, Tomonori Suzuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Atomic force microscopic image data of botulinum neurotoxin complexes with different molecular sizes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 104193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2019.104193	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細谷 圭汰、唐津 修羅、栗原 淳、菅原 千広、黄 インシュン、渡辺 薫、丹羽 光一、相根 義昌
2. 発表標題 ボツリヌスD型菌4947株培養液中に出現するボツリヌス毒素タンパク質複合体の経時変化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原 淳、黄 インシュン、細谷 圭汰、菅原 千広、唐津 修羅、渡辺 薫、丹羽 光一、相根 義昌
2. 発表標題 ボツリヌスD型神経毒素複合体によって誘導される小腸上皮細胞の細胞骨格の形状変化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黄 インシュン、栗原 淳、菅原 千広、細谷 圭汰、唐津 修羅、渡辺 薫、丹羽 光一、相根 義昌
2. 発表標題 ボツリヌス毒素複合体の各種上皮細胞に対する影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅原 千広、栗原 淳、黄 インシュン、唐津 修羅、細谷 圭汰、渡辺 薫、相根 義昌、丹羽 光一
2. 発表標題 ポツリヌス毒素複合体の小腸上皮細胞に対する細胞毒性
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 唐津 修羅、細谷 圭汰、黄 インシュン、菅原 千広、栗原 淳、渡辺 薫、丹羽 光一、相根 義昌
2. 発表標題 ポツリヌスC型菌Voichi株が産生する毒素複合体の構造と機能の変化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺 薫、栗原 淳、細谷 圭汰、唐津 修羅、菅原 千広、黄 インシュン、丹羽 光一、相根 義昌
2. 発表標題 ポツリヌス神経毒素結合タンパク質NTNHAのアクチン依存性細胞内輸送
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------