

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380191
 研究課題名（和文）細菌毒素感染機構を利用したドラッグデリバリーシステムの試作
 研究課題名（英文）The experimental production of the drug delivery system using a bacterial-toxin infection mechanism.
 研究代表者
 西河 淳（NISHIKAWA ATSUSHI）
 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授
 研究者番号：30218127

研究成果の概要（和文）：ボツリヌス毒素複合体は、複合体を構成する糖結合性タンパク質の作用により消化管上皮細胞バリアーを巧みに通過し毒素を体内循環系に移行する機構を有しており、この仕組みを解明すれば新たなドラッグデリバリーシステムやワクチン開発への応用が期待される。本研究では、C型毒素複合体の糖結合性タンパク質 HA1, HA3 に関して、コラーゲン結合性という HA3 の新たな性質の発見と共に、HA1 の変異体ごとに異なる認識糖への結合性の詳細を立体構造も含めて明らかにし、新たな性質を持つ複合体創製への基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：The botulinum toxin complex has the clever mechanism of the neurotoxin transit across the intestinal epithelial barrier using the lectin components. So it seems that the elucidation of this mechanism can be applied to the new drug delivery system and the vaccine development. In this study, we demonstrate that the type C HA3 can bind to the collagen. We also show the architecture and the properties of sugar-binding site of each HA1 mutants. These results yield new insights into the experimental planning of the creation of new complexes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：生化学，農芸化学

科研費の分科・細目：境界農学，応用分子細胞生物学

キーワード：ボツリヌス毒素，レクチン，ドラッグデリバリー

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1. 研究開始当初の背景
ボツリヌス菌の産生する神経毒素（NTX） | はその抗原性の違いにより A～G 型に分けられ、何れも分子量約 15 万でプロテアーゼ活 |
|--------------------------------------|--|

性を持ち、標的神経細胞に到達して侵入し、強い中毒を引き起こす。コレラ毒素やペロ毒素をはじめ多くの細菌由来タンパク性毒素は、宿主細胞表面への結合部位と毒性を發揮する部位の二つの部分から構成されたいわゆる A-B 構造をとっており、近年それぞれの作用機構の解明が進んでいる。ボツリヌス菌の産生する NTX も A-B 構造をしているが、本毒素が持つ他と異なる大きな特徴は、菌の培養上清や食品中で NTX に機能未知の無毒タンパク質や糖鎖結合活性を持つ二種類の HA タンパク質が複数結合して、分子量 30 万 (12S)、50 万 (16S) や 90 万 (19S) といった巨大な毒素複合体となって存在していることである。これまでこれら毒素複合体構成成分は、食品と共に経口摂取され消化管を通過する際に NTX をプロテアーゼの作用から守る役割と、消化管内から上皮細胞層バリアーを通過して体内循環系に神経毒素を送り込むいわゆるトランスサイトーシスに関与しているのではないかと考えられていた。そして A 型や B 型の毒素複合体では実際上皮細胞によるトランスサイトーシスが観察されたが、そのメカニズム、移行経路については全く不明で詳細な解明が待たれていた。最近、我々は C 型の毒素複合体 (C16S) が、ヒト結腸癌由来培養細胞 HT-29 の細胞表面ヘムチン様糖タンパク質糖鎖のシアル酸を介して結合し、エンドサイトーシスの機構で細胞内に取り込まれ、エンドソームからゴルジ装置にまで達していることを見いだした。ゴルジ装置は細胞内輸送の選別センターといわれており、上皮細胞内で apical 側と basolateral 側へのタンパク質輸送の起点となっている。これより、現在毒素がゴルジ装置からいかにして細胞外 (basolateral 側) へ分泌されるかについて検討を加えており、細胞内トランスサイトーシス機構の全容が明らかにされつつある。

また、細胞表面への結合においては、毒素複合体や複合体構成成分 HA1、HA3 が親和性を示す細胞表面糖鎖構造の解析を、精製ムチン糖タンパク質や各種合成糖鎖を用いて検討し、HA1 はシアル酸の他、ガラクトースや N-アセチルガラクトサミン等の中性糖にも親和性を示すことを推定した。さらに、リコンビナント HA1 の結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行ったところ、HA1 はタンパク上の同一の部位でシアル酸、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミンなど複数の種類の糖と結合できることが確認でき、その結合部位 (サイト) クレフト内の特定のアミノ酸を別のものに置換すると親和性を示す糖の種類や糖への結合力が変化することも発見した。また、別の部位のアミノ酸を置換して新たな糖結合サイト (サイト) の創出にも

成功し、それらもまた糖の結合特異性を変化させられる可能性を見いだした。このことは、アミノ酸置換により結合する糖の種類や数を自在にデザインした多様なリコンビナント HA1 を創製できることを意味している。

一方、HA3 については、シアル酸にのみ強く結合することが判明したが、結晶構造解析から複体内において 3 枚羽根のプロペラ様のユニークな構造をしており、未知の機能を持つ可能性も考えられる。

もう一点、ボツリヌス毒素複合体の特徴は、C 型、D 型ボツリヌス毒素複合体構成成分のモノマー化と複合体の再構築が試験管内で行えることにある (Microbiology, 2005, 151, 1475-1483)。これにより、複合体 1 分子に含まれる 6 分子の HA1 と 3 分子の HA3 を任意の割合で変異体の HA1 や HA3 に替えれば、認識する糖鎖の種類や構造が異なる新規複合体を多種類創製することが可能と思われる。

2. 研究の目的

ボツリヌス毒素複合体は、上皮細胞の基本的な生理作用を巧みに利用し、上皮細胞バリアーを通過して NTX を体内循環系に送り込んでいる。そこで、我々はこの機構を利用して NTX の代わりに有用高分子物質を目的細胞・組織或いは体内に送達・移行させるドラッグデリバリーベクターを創製することを最終の目的とし、一連の研究の端緒として、まず HA1 や HA3 のより詳細な性質や機能を解析するとともに、新しく作製した変異 HA1 の構造と性質も詳細に明らかにして、多種類の糖認識 HA1 を取りそろえ、細胞種ごとに異なり複雑多様な細胞表面糖鎖構造を的確に識別する複合体の創製を準備する。

3. 研究の方法

(1) HA3 の性質の検討

大腸菌で発現させた GST 融合 HA3 やマルトース結合タンパク融合 HA3 を各種クロマトグラフィーで精製したものを性質の検討に用いた。

コラーゲンへの結合性を見るためには、96 ウエルマイクロタイタ - プレートに 型コラーゲンをコーティングし、結合した HA3 量をウサギ抗 HA3 抗体 HRP 標識抗ウサギ抗体、ルミノールによる発光で定量した。

(2) HA1 ミュータントの性質と構造の検討

HA1 に 2 カ所ある糖結合部位サイト 1、サイト 2 のクレフト内アミノ酸を置換した変異 HA1 (W176A, NQ278AA, F179I, W176A/D271F, WT 他) を大腸菌で大量に発現させ精製し、等温滴定カロリメトリー (機種: iTC₂₀₀ Micro Calorimeter, 20 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.4, 30 の条件) で種々の糖に対する結合力を検討した。また、それぞれをハンギングドロツ

ブ蒸気拡散法で結晶化し，糖結合部位の構造と糖との相互関係をソーキング法により解析した．

4. 研究成果

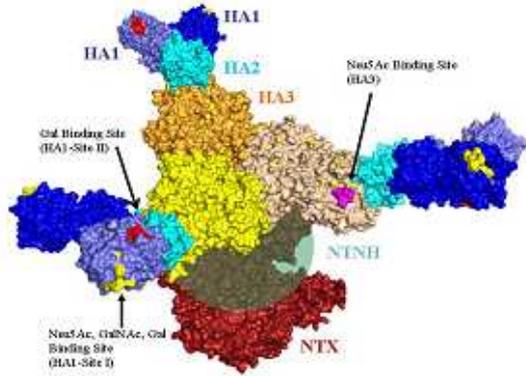


図1 C型ボツリヌス毒素複合体の推定構造
3枚羽根状のHA3 3分子(黄, オレンジ, 黄土色)にHA1(青, 水色)が2分子ずつ結合しており, 糖結合サイト(黄: HA1サイト, 赤: HA1サイト, ピンク: HA3の糖結合サイト)を大きく外に伸ばしたような形をとる
(J. Biol. Chem. 282, 24777-83, 2007, J. Mol. Biol. 385, 2009, 1193-1206, 参照).

(1) HA3の性質の検討

Dali server を用いて, HA3の立体構造と相同性の高いタンパク質を検索したところ, *Clostridium histolyticum*由来コラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインとHA3のbドメイン, bドメイン- にそれぞれZスコア7.7と9.4で相同性があることが判明した.

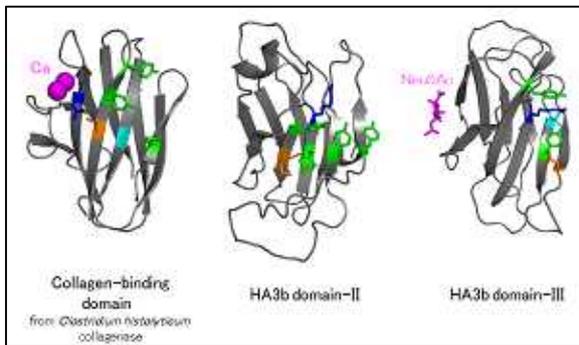


図2 HA3と立体構造の相同性の高いコラゲナーゼの立体構造. 左のコラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインには緑で示したチロシン残基, 青で示したアルギニン残基等がコラーゲンとの結合に重要な役割を果たしているとしており, 右のHA3bドメインにも同様な位置にチロシン, アルギニンが存在している.

そこで, コラーゲン固相化マイクロタイプレートでコラーゲンへの結合能を測定したところ, 非常に強く結合することが確認できた. しかし, C型コラーゲンの分解活性は見られなかった. 小腸上皮細胞からの毒素複合体体内移行機構に於いては, 上皮細胞のトランスサイトーシスやタイトジャンクション破壊による進入経路などが考えられるが, 今回我々の見いだしたHA3のコラーゲンへの結合能は, 未だ判明していない毒素の体内侵入経路の解明に大変有用な知見を与えるもので, 今後は上皮細胞等の足場となっているC型コラーゲン等への作用も詳細に検討し, HA3や毒素複合体の巧みな侵入機構の全容解明につなげたい.

(2) HA1ミュータントの性質と構造の検討

C型ボツリヌス毒素複合体構成成分であるHA1の2カ所ある糖結合クレフト内の特定アミノ酸を別のアミノ酸に置換することによりムチンに対する結合性が変化したミュータントを複数種調整し, 各々で異なる糖結合特異性の違いをX線結晶構造解析の面から考察を加えた.

一例を挙げて具体的に述べると, シアル酸, ガラクトース, N-アセチルガラクトサミンに結合するサイト1のミュータントF179Iは, シアル酸を多く含むウシ顎下腺ムチン(BSM)に対する結合能が低下しているが, シアル酸含量の低いムチンブタ胃ムチン(PGM)に対

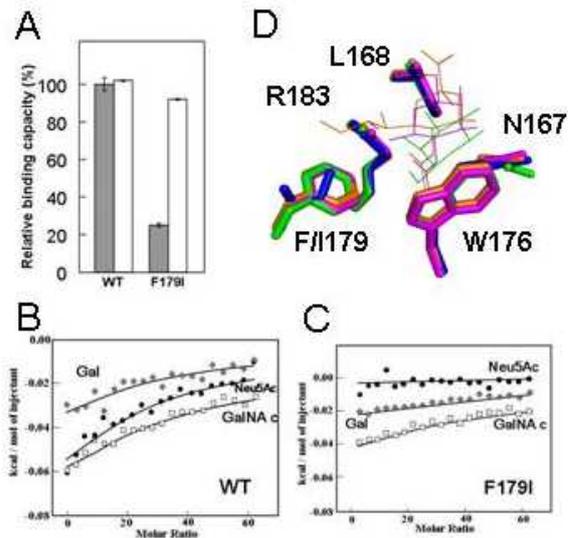


図3 HA1 F179Iの糖結合力と構造
A: BSM(グレー), PGM(シロ)に対するF179Iの結合性. B, C: WT, 変異体とNeu5Ac, Gal, GalNAcとの結合に伴う発熱量の変化を等温滴定カロリーメトリーで測定しプロットしたもの. D: WT-Neu5Ac(オレンジ), WT-Gal(緑), WT-GalNAc(ピンク)のHA1-糖結合部位の部分構造にF179Iの立体構造(青)を重ねたもの. 細い線が糖を表す.

しての結合能に変化はなかった(図3A)。また、ムチンに対する結合能はシアル酸で阻害がかからなくなっていた。等温滴定カロリメトリーで *N*-アセチルノイラミン酸、ガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミンに対する解離定数(Kd)を求めたところ、*N*-アセチルノイラミン酸に対する値のみ大きく変化していた(図3B, C)。F179IのX線結晶構造解析による立体構造は解像度 1.48 Å で得られ、WTと比較して立体構造にはほとんど変化はなかった。F179Iの結晶に単糖はソーキングできなかつたため、WTに単糖が結合したモデルを利用してF179Iのモデルをスーパーインポーズして、WTと179Iのサイトの構造変化と、リガンド糖との相互作用の変化を検証してみた。その結果、F179IのサイトとWTの構造に大きな変化は生じておらず、もともとF179が存在していた空間にちょうどイソロイシンが入り込んだ構造になっていた。そして、イソロイシンと最も近接しているNeu5Acの炭素原子でも、その距離が2.78 Åであったことから、フェニルアラニンからイソロイシンへの置換によるシアル酸結合能の低下は、イソロイシン側鎖が立体障害を起こしているのではなく、Neu5Acの7位、9位の炭素に対し、フェニルアラニンの環状構造全体での強い疎水性相互作用に比べ、イソロイシンは弱い疎水性相互作用しか取り得ないために起きているのではないかということが考えられた。

その他の変異体についても、例えば二箇所変異を入れたW176A/D271Fではガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミンに対する解離定数がWTの10~20倍に強くなっている等それぞれのHA1変異体の各糖に対するKd値を等温滴定カロリメーターにより測定し、X線結晶構造解析から結合部位構造と結合糖との立体的相互関係を検討する等同様な検証を行った。そして、これらの情報の蓄積は、創製を目指すDDSやワクチン開発に於いて、対象となる臓器や細胞を識別するために必要な認識糖の異なるレクチンライブラリーの充実につながり、さらに、これらを基に、現在HA1の二箇所の糖結合サイトを立体構造のコンピュータシミュレーションから改変し、新たな糖結合能を持つ変異体のさらなる創作も試みている。

今後は、HA3のコラーゲンへの結合性他諸性質をさらに詳細に解明すると共に、新たなHA1変異体の作製とそれらの組み合わせによる複合体を創製し、種、組織、細胞ごとに異なる多種多様な糖鎖構造に対応した個別のDDS、ワクチン作製ベクターの開発を目指す。

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13件)

Toshio Nakamura, Mao Kotani, Takashi Tonozuka, Azusa Ide, Keiji Oguma, Atsushi Nishikawa, Crystal Structure of the HA3 Subcomponent of *Clostridium botulinum* Type C Progenitor Toxin, *J. Mol. Biol.* 査読有, 385, 2009, 1193-1206.

Toshio Nakamura, Takashi Tonozuka, Azusa Ide; Ta. Yuzawa; Keiji Oguma, Atsushi Nishikawa, Sugar-binding sites of the HA1 subcomponent of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin, *J. Mol. Biol.* 査読有, 376, 2008, 854-867.

Toshio Nakamura, Takashi Tonozuka, Mao Kotani, Kanae Obata, Keiji Oguma, Atsushi Nishikawa, Crystallization and preliminary X-ray analysis of HA3 component of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin, *Acta Cryst.*, 査読有, F63, 2007, 1038-1040.

Jae-Chul Lee, Teruhiko Yokoyama, Hyun-Jung Hwang, Hideyuki Arimitsu, Yumiko Yamamoto, Makiko Kawasaki, Tomoko Takigawa, Kouichi Takeshi, Atsushi Nishikawa, Hiromi Kumon, Keiji Oguma, Clinical application of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin purified by a simple procedure for patients with urinary incontinence caused by refractory destrusor overactivity, *FEMS Immunol. Med. Mic.* 査読有, 51, 2007, 201-211.

Tomonori Suzuki, Hirokazu Kouguchi, Toshihiro Watanabe, Kimiko Hasegawa, Tohru Yoneyama, Koichi Niwa, Atsushi Nishikawa, Jae-Chul Lee, Keiji Oguma, Tohru Ohyama, Effect of nicking the C-terminal region of the *Clostridium botulinum* serotype D neurotoxin heavy chain on its toxicity and molecular properties, *Protein J.* 査読有, 26, 2007, 173-181.

(他、査読あり論文 8編)

[学会発表](計15件)

中村 紀夫,伊藤 さかえ,佐藤 龍太郎, 殿塚 隆史,武田 陽一,松尾 一郎,伊藤 幸成,小熊 恵二,西河 淳,C型ボツリヌス毒素複合体の構成成分 HA1 の糖認識特異性のマニピュレーション,日本生化学会,2008年12月12日,神戸

大野 ひろみ, 中村 紀夫, 西河 淳, 石田 秀治, 木曾 真, ボツリヌス毒素のリガンド探索に向けたムチン型糖鎖の設計及び合成とその毒素結合能, 日本農芸化学会, 2008年3月28日, 名古屋

中村 紀夫, 佐藤 龍太郎, 殿塚 隆史, 小熊 恵二, 西河 淳, C型ボツリヌス毒素複合体構成成分, HA1の糖特異性改変に関する検討, 日本農芸化学会, 2008年3月27日, 名古屋

Mao Kotani, Toshio Nakamura, Takashi Tonozuka, Azusa Ide, Ryutarō Sato, Keiji Oguma, Atsushi Nishikawa, Crystal structure of *Clostridium botulinum* type C HA3 component, 日本生化学会 2007年12月13日, 横浜

大野 ひろみ, 佐藤 哲郎, 中村 紀夫, 西河 淳, 石田 秀治, 木曾 真, ボツリヌス毒素のリガンド探索に向けたムチン型糖鎖の合成と生物活性, 日本糖質学会, 2007年8月1日, 福岡

(他 10件)

〔図書〕(計4件)

小熊 恵二, 西河 淳, 医薬ジャーナル社, 病原菌の今日的意味(改訂第4版), 出版確定印刷中, 2010.

Atsushi Nishikawa (Naoyuki Taniguchi et al. Ed), Springer, Experimental Glycoscience, 2008, pp.230-232.

Atsushi Nishikawa, Keiji Oguma (Naoyuki Taniguchi et al. Ed), Elsevier, Comprehensive Glycoscience IV, 2007, pp.453-463.

小熊 恵二, 西河 淳(倉光世紀, 杉山政則 編集), 共立出版, 構造生物学 - ポストゲノム時代のタンパク質研究 -, 2007, pp.113-125.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西河 淳 (NISHIKAWA ATSUSHI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授

研究者番号: 30218127

(2) 研究分担者

殿塚 隆史 (TONOZUKA TAKASHI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究

院・准教授

研究者番号: 50285194

(H19 H20: 連携研究者)

土肥 多恵子 (DOHI TAEKO)

国立交際医療センター・消化器疾患研究部・部長

研究者番号: 60250221

(H19 H20: 連携研究者)

(3) 研究協力者

武田 陽一 研究員, 松尾 一郎 研究員 (現群馬大学教授), 伊藤 幸成 主任研究員 (以上, 理化学研究所)

中村 紀夫 研究員 (現(財)野口研究所)

小熊 恵二 教授(岡山大学大学院)