

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06142・19K21257

研究課題名（和文）B型ボツリヌス毒素複合体の腸管吸収機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of intestinal absorption of botulinum toxin complex type B

研究代表者

阿松 翔（Amatsu, Sho）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90827346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：B型ボツリヌス毒素複合体の腸管吸収受容体として同定した候補分子の機能解析を行った。in vitroでは、腸管上皮細胞モデルとしてCaco-2細胞およびCMT-93細胞を用いた。蛍光免疫染色法により、細胞の頭頂部側からエンドサイトーシスした毒素複合体の細胞内小胞は候補分子と共局在することが明らかになった。Caco-2細胞およびCMT-93細胞を基にCRISPR法で候補分子欠損細胞を樹立しており、エンドサイトーシスおよびトランスサイトーシス効率の解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボツリヌス毒素複合体は食中毒の原因因子であり、致死率の高い毒素として知られている。経口摂取された毒素は腸上皮から吸収される。本毒素の腸管吸収機構を理解することで、ボツリヌス症の病態発症メカニズムを解明することができる。また、発症メカニズムを基にしたボツリヌス症に対する新たな治療法の開発へ繋がるのが期待できる。

研究成果の概要（英文）：I studied the interaction between botulinum toxin complex type B and the candidate proteins which were identified as transcytosis receptor in intestinal epithelia. In in vitro experiments, Caco-2 cell and CMT-93 cell were used as an intestinal absorption model. In these cells grown on a transwell filter, the candidate protein is co-localized with botulinum toxin complex endocytosed from apical membrane of the cell. Caco-2 cell and CMT-93 cell were transfected with a CRISPR-Cas9 plasmid. After clone isolation, I will analyze the endocytosis and transcytosis efficiency of the cells lacking the candidate protein.

研究分野：細菌毒素

キーワード：ボツリヌス毒素 ヘマグルチニン 腸管吸収 トランスサイトーシス

## 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 (botulinum neurotoxin, BoNT) は亜鉛依存性プロテアーゼであり、小胞の細胞内膜融合装置として機能する SNARE タンパク質を切断することで神経伝達物質の開口放出を阻害する。本毒素は 7 つの血清型(A-G 型)に分類され、A、B、E 及び F 型がヒトに中毒を引き起こす。BoNT は無毒タンパク質の non-toxic non-hemagglutinin (NTNHA)及び hemagglutinin (HA)と複合体を形成した M 毒素または L 毒素として、*Clostridium botulinum*(ボツリヌス菌)などから産生される。M 毒素は BoNT と NTNHA、L 毒素は BoNT、NTNHA 及び HA により構成される。NTNHA は BoNT と絡み合う形で複合体を形成し、酸性 pH や消化管プロテアーゼ存在下における変性及び分解から BoNT を保護する役割を担う。HA はガラクトースやシアル酸を介して腸管上皮細胞上の糖タンパク質に結合することや E-cadherin への結合を介した細胞間接着阻害により細胞間バリアを破壊することが知られている。HA を含む神経毒素複合体 (L 毒素) は他の複合体(M 毒素)と比較してマウス経口毒性が約 700 倍高いことが報告されている (Sakaguchi, *Pharmacol. Ther.* 1982)。

食餌性ボツリヌス症において、経口摂取されたボツリヌス神経毒素複合体は小腸から吸収される。近年、申請者らの研究グループは A 型 L 毒素が腸管の microfold 細胞(M 細胞)から特異的に吸収されることを報告した (Matsumura, *et al. Nat. Commun.* 2015)。小腸にはパイエル板と呼ばれるリンパ小節が存在する。M 細胞はパイエル板の粘膜上皮に散在する抗原の取り込みに特化した細胞であり、腸管腔側からトランスサイトーシスによって細菌などの腸内の外来抗原を積極的に運び込む役割を担う。マウスに経口投与した A 型 L 毒素は M 細胞に発現する Glycoprotein-2 (GP-2)などの糖鎖修飾された GPI アンカー型タンパク質に HA を介して結合し、M 細胞から選択的に吸収される。抗 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)抗体の投与によって M 細胞の分化を抑制したマウスや GP-2 ノックアウトマウスはコントロールマウスと比較して経口投与した A 型 L 毒素に対して有意に耐性を示す。一方で、他の血清型のボツリヌス神経毒素の腸管吸収機構については解析されていない。申請者らは、A 型神経毒素複合体と同様にヒトにボツリヌス症を引き起こす B 型神経毒素複合体について、マウス腸管結紮ループレ法を用いて毒素の局在を解析した結果、B 型 L 毒素は A 型 L 毒素とは異なり絨毛上皮からも吸収されることを見出した (Matsumura & Amatsu, *unpublished data*)。

### 2. 研究の目的

本研究では、B 型 L 毒素が絨毛上皮細胞の管腔側から基底膜側へトランスサイトーシスするための受容体を同定し、毒素と受容体の相互作用を解明することを目的とする。食餌性ボツリヌス症において、ボツリヌス神経毒素が体内に侵入するためには腸管上皮細胞層を透過することが必須であり、腸管吸収におけるトランスサイトーシス受容体を同定することによりボツリヌス症の病態発症機構を解明する。

### 3. 研究の方法

申請者の先行研究より、HA を固相化したビーズを用いてマウス腸管上皮ライセートからブルダウンを行い、マス解析により B 型神経毒素複合体の絨毛上皮細胞にけるトランスサイトーシス受容体の候補分子を同定した (Amatsu, *unpublished data*)。そこで、候補分子が発現していること、および極性化して経上皮電気抵抗値 (transepithelial resistance, TER) が上昇することを条件に機能解析を行うための培養細胞を探索した。Addgene 社から SpCas9 プラスミド (PX459) を購入し、標的配列の gRNA は CRISPRdirect を用いて設計した。作製したプラスミドを培養細胞にリポフェクションし、候補分子欠損細胞を作製した。トランスウェルに単層培養した培養細胞を用いて、HA を頭頂部側に添加した 48 時間後に側底部側の培養液を回収し、イムノブロットによりトランスサイトーシス量を測定した。

候補分子の全身ノックアウトマウスは胎生致死になることが既に報告されている。そこで、候補分子の Flox マウスと腸管上皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Villin-Cre マウスを交配して腸管特異的ノックアウトマウス (conditional knock-out (cKO) マウス) を作製した。マウスに B 型神経毒素複合体を腹腔内投与または経口投与し、ボツリヌス症の発症および致死を 12 時間毎に観察した。

### 4. 研究成果

候補分子はほぼ全身の組織に普遍的に発現することが明らかになっている。そこで、当研究室が保有する腸管上皮由来細胞を検討した結果、ヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞およびマウス直腸がん由来 CMT-93 細胞は候補分子を発現し、且つ単層培養で TER を上昇させることが明らかになった。細胞ライセートを用いたイムノブロットの結果、Caco-2 細胞では候補分子の他にタンパク質構造の似たファミリータンパク質 (以下 F タンパク質とする) も発現していることが明らかになった。CMT-93 細胞では F タンパク質は発現していなかった。マウス組織における小腸上皮細胞では候補分子は発現しているが、F タンパク質は発現していないことが報告されている。以上より、HA および神経毒素複合体のトランスサイトーシスを検証する *in vitro* モデルとして CMT-93 細胞が適していることが示唆された。単層培養した CMT-93 細胞の頭頂部側から HA を添加した結果、親株と比較して候補分子欠損細胞では HA の側底部側への移行量が抑制された。以上の結果から、CMT-93 細胞において、HA は候補分子を介して頭頂部側から側底部側へトランス

サイトシスすることが示唆された。今後、欠損細胞に候補分子発現プラスミドを導入し、表現型が相補されるかを検証する予定である。

候補分子を腸管特異的に欠損した候補分子-cKO マウスでは胎生致死は回避され、ホモ欠損マウスの成体を得た。15 週齢の雄マウスに B 型神経毒素複合体を腹腔内投与した結果、コントロールマウスと cKO マウスは同等の感受性を示した。一方で、B 型神経毒素複合体を経口投与した結果、コントロールマウスと比較して cKO マウスで致死が遅延する傾向が観察された。今後、個体数を増やすことで有意な表現型であるかを検証する予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sho Amatsu and Yukako Fujinaga	4. 巻 2132
2. 論文標題 Botulinum Hemagglutinin: Critical Protein for Adhesion and Absorption of Neurotoxin Complex in Host Intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 183-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0430-4_19	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 油谷雅広, 藤永由佳子
2. 発表標題 E-cadherin機能阻害活性を維持した最小化ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンの開発
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 油谷雅広, 藤永由佳子
2. 発表標題 B型ボツリヌス毒素複合体を構成するHA成分の多価性が上皮細胞間バリア破壊活性に与える影響
3. 学会等名 第55回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 油谷雅広, 藤永由佳子
2. 発表標題 E-cadherin機能阻害活性を維持した最小化ボツリヌス菌ヘマグルチニン由来物質の開発
3. 学会等名 第65回トキシシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿松翔, 藤永由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス毒素複合体のヘマグルチニンがアドヘレンスジャンクションへ移行するための輸送経路の解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿松翔, 金美海, 松村拓大, 紀ノ岡正博, 藤永由佳子
2. 発表標題 ボツリヌス毒素複合体の無毒成分ヘマグルチニン(HA)を利用したiPS細胞の大量培養技術と最小化HAの開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Amatsu, Takuhiro Matsumura, Yukako Fujinaga
2. 発表標題 Molecular engineering of Nano HA, a minimal protein that inhibits E cadherin mediated cell cell adhesion derived from Clostridium botulinum hemagglutinin
3. 学会等名 56th Intergency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿松翔, 藤永由佳子
2. 発表標題 ボツリヌスHAはどのようにしてアドヘレンスジャンクションへたどり着くのか
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 油谷雅広, 藤永由佳子
2. 発表標題 E-cadherin機能阻害活性を有するボツリヌス菌由来ヘマグルチニンの最小化とその作用機序
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会 第19回日本蛋白質科学会年会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿松翔, 塚正彦
2. 発表標題 乳児ボツリヌス症検索の試みとB型ボツリヌス毒素複合体ヘマグルチニン成分の解析
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----