

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 8月22日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) 一般

研究期間：2010～2012

課題番号：22590405

研究課題名（和文） 腸管上皮細胞に存在するボツリヌス毒素受容体タンパク質の同定

研究課題名（英文） Identification of the botulinum toxin receptor protein on the intestinal epithelial cells

研究代表者

渡部 俊弘 (WATANABE TOSHIHIRO)

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：80175695

研究成果の概要（和文）：ボツリヌス毒素複合体（TC）は、神経毒素と NTNHA、HA-70、HA-33 および HA-17 から構成される。TC は小腸上皮から血管内へと侵入する。本研究では、TC 中の HA-33 の構造の違いに従って結合する糖鎖が異なること、NTNHA が小腸上皮細胞からの透過に関わることを見出した。さらに、HA-33 および NTNHA と結合する小腸上皮細胞膜上タンパク質を分離することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Botulinum toxin complex (TC) is composed of neurotoxin, NTNHA, HA-70, HA-33, and HA-17. TC enters into blood stream via small intestinal epithelium. In this study, we revealed that the toxin complex binds to the different sugar-chain depending on the structure of the HA-33 protein, and the NTNHA protein has an ability penetrate through the intestinal epithelial cell monolayer. Additionally, we isolated the membrane proteins of the intestinal epithelial cells that bind to the HA-33 or NTNHA protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：細菌学（含真菌学）

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌が産生する神経毒素は血清型により A から G 型に分類され、ヒトや家畜に対する毒性は異なる。ボツリヌス神経毒素は、無毒成分（NTNHA）および 3 種類の血球凝集素（HA-70、HA-33 および HA-17）と結合し、750kDa の毒素複合体として存在する。毒素複合体は経口摂取されると小腸から体内へ侵入し、神経毒素が神経終末のアセチルコリンの放出を阻害し神経麻痺をもたらす。

神経毒素および毒素複合体は、腸管上皮の

糖鎖に結合することが示唆されているが、その糖鎖を有する毒素結合受容体タンパク質は未定である。

本研究課題は、神経毒素および毒素複合体が結合する小腸上皮細胞のレセプター分子を同定し、毒素の体内への侵入機構を明らかにすることである。

2. 研究の目的

著者らの一連の研究から、ボツリヌス神経毒素および毒素複合体は腸管上皮細胞の糖

鎖に結合することが示唆されている。しかし、その糖鎖を有する受容体タンパク質は不明である。本研究では、申請者の研究グループが開発した精製技術を用いて、ボツリヌス菌の培養液から神経毒素および毒素複合体を精製する。これらの毒素タンパク質が結合する培養小腸上皮細胞 (IEC-6) の受容体を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 毒素複合体の産生と精製

TC の産生および精製は、常法にしたがった。

(2) 神経毒素および NTNHA の精製

神経毒素/NTNHA 複合体を Hiroad 16/60 Superdex 200 pg ゲルろ過カラムにより精製した。精製した複合体は、アルカリ条件下での Hiroad 16/60 Superdex 200 pg ゲルろ過カラムによって神経毒素と NTNHA を分離させた。それぞれのタンパク質は、Mono Q HR 5/5 イオン交換カラムに負荷しさらに精製した。

(3) HA-33/HA-17 複合体の精製

L-TC (神経毒素/NTNHA/HA 複合体) を、4.0 M Guanidine hydrochloride 存在化でそれぞれのタンパク質に分離させ、HiLoad 16/60 Superdex 200 pg ゲルろ過カラムでそれぞれ精製した。

(4) ラット小腸上皮細胞株の培養

細胞は、小腸上皮のモデルとして、ラット小腸上皮株化細胞 (Rat small intestine epithelial cells; IEC-6; RIKEN Bio Resource Center, Tsukuba, Japan) を用いた。培養液は、10 % (v/v) FBS、100 IU/mL Penicillin および 100 µg/mL Streptomycin を含む DMEM を用いた。細胞は、37 °C、CO₂ 濃度を 5% (v/v) に保たれた CO₂ インキュベーター (Model MCO-5AC, SANYO, Osaka, Japan) 内で培養した。培養中は、培養液を 2~3 日ごとに交換した。

(5) 毒素の細胞への結合実験

細胞を 24 穴マルチウェルプレート (Corning, NY, USA) に播種し、密になるまでに培養した。KHB を用いて調製した L-TC (50 nM, 100nM)、HA-33/HA-17 (150 nM, 300 nM) 300 µl を細胞に添加し、4°C で 1 時間インキュベートした。その後、4°C の KHB で 3 回洗浄し、150 µl の 1×SDS sample buffer を加え、10 分間煮沸した。細胞に結合したタンパク質は、SDS-PAGE に供し、Western blot により抗 HA-33 抗体を用いて検出した。

(6) 毒素の赤血球への結合試験

タンパク質濃度を 50 nM、100 nM に調製した L-TC および 150 nM、300 nM に調製した

HA-33/HA-17 20 µl に、40 µl の 4% (w/v) BSA を含む 0.15 M Phosphate buffer (pH 7.0) を混合し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、1% (v/v) ウマ血球浮遊液を 20 µl 加え、さらに室温で 30 分間インキュベートした。血球を遠心分離により回収し、10 µl の SDS 処理 buffer を用いて溶解し、10 分間煮沸した。血球に結合したタンパク質は、SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロットにより抗 HA-33 抗体を用いて検出した。

(7) 毒素の細胞層透過試験

細胞透過試験は、上槽と下槽がポリカーボネート半透膜で仕切られたトランスウェルを用いた。あらかじめ、トランスウェルの上槽に細胞を培養する。その後、上槽に種々の組換えタンパク質を添加し、37°C で一定時間インキュベートする。下槽に透過したタンパク質の検出はウエスタンブロットによって行った。

(8) ウエスタンブロット

タンパク質の膜への転写は常法にしたがった。ブロッティング終了後、10% (w/v) Skim milk を含む Tween PBS (pH 7.4) で 1 時間ブロッキングした。その後、抗 HA-33 抗体を 5000 倍希釈した 10% (w/v) Skim milk を含む Tween PBS (pH 7.4) に浸し、4°C で一晩浸透した。Tween PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄した後、HRP 標識 Goat 抗 Rabbit イムノグロブリン G (Immunoglobulin G; IgG) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を 5000 倍希釈した 10% (w/v) Skim milk を含む Tween PBS (pH 7.4) に浸し、室温で 1 時間浸透した。膜を Tween PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄後、Immobilon™ Chemiluminescent Western HRP Substrate (Millipore, MA, USA) に膜を浸し、化学発光させ、Light-Capture II (Model AE-6981, ATTO) を用いてバンドを検出した。

(9) 毒素の細胞への取り込み実験

タンパク質の蛍光標識は、GE Healthcare 社の Cy3 ラベリングキットを使用した。ガラスチャンバースライド上で培養した IEC-6 細胞へ、蛍光標識したタンパク質を加え、4°C で 30 分間インキュベートした。細胞を KBH で洗浄後、37°C で 10-20 分間インキュベートした。細胞内に取り込まれたタンパク質は、共焦点顕微鏡によって観察した。

(10) 組換えタンパク質の調製

大腸菌 BL21 株へ形質転換した recombinant HA-33 (rHA-33) あるいは recombinant NTNHA (rNTNHA) 発現形質転換体を培養し、各種カラムクロマトグラフィーにより精製したものを標品として用いた。

(11) IEC-6 細胞膜タンパク質画分の調製
IEC-6 の膜タンパク質抽出には、ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit (M-PEK; Merck Novagen®)、あるいは ProteoExtract® Native Transmembrane Protein Extraction Kit (TM-PEK; Merck Novagen®) の 2 種類のキットを用いた。

4. 研究成果

(1) C 型菌 Yoichi 株 L-TC の糖認識解析

ボツリヌス C および D 型菌が産生する L-TC は、その構成タンパク質のうちの 1 つである HA-33 のシアル酸認識により血球凝集活性および小腸上皮細胞への結合を示すことが明らかにされている。一方、C 型菌 Yoichi 株 (C-Yoichi) は、HA-33 に変異をもつ L-TC を産生するが、本毒素は、血球凝集活性を示さないことが示されていた。本研究で、著者らは、C-Yoichi L-TC がノイラミナーゼで処理した血球に対して凝集活性を示すことを新規に見出した (表 1)。

表 1. Native あるいはノイラミナーゼ処理した赤血球に対する血球凝集活性

L-TC	Native	Neuraminidase treated
C-St	2 ⁶	2 ⁴
C-Yoichi	—* or 2 ¹	2 ⁸

*Negative at 100 µg/ml L-TC

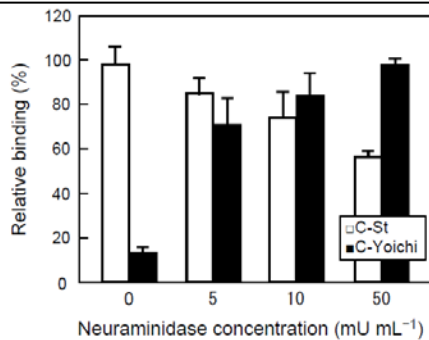


図 1. C-St および C-Yoichi L-TC のノイラミナーゼ処理赤血球に対する結合活性
赤血球を 37°C で 1 時間ノイラミナーゼ処理した後、200 µg/ml の C-St および C-Yoichi L-TC を添加し室温で 30 分間インキュベートした。ウエスタンブロットによる結合量の決定は C-St の未処理赤血球への結合量として算出した。実験は 3 連で行った。

血球への結合活性についても同様にノイラミナーゼ処理した血球に対してのみ活性を示した (図 1)。HA-33 に変異をもたない C 型 L-TC [C 型菌 Stockholm 株 (C-St) 由来] については、血球のノイラミナーゼ処理により凝集活性・結合活性の両方が低下した (表 1、図 1)。C-Yoichi L-TC の血球凝集活

性はガラクトースおよびラクトースによって阻害されたことから、本毒素は、他の C および D 型 L-TC (シアル酸を認識) と異なり、ガラクトースを認識することが明らかとなった (表 2)。

表 2. ノイラミナーゼ処理した赤血球に対する C-St および C-Yoichi L-TC の血球凝集活性への糖の影響

Sugar (100 mM)	C-St	C-Yoichi
None	2 ⁴	2 ⁸
Neu5Ac	—*	2 ⁶⁻⁷
Gal	2 ³	—
Lac	2 ³	—
GalNAc	2 ⁴	2 ³

*Negative at 100 µg/ml L-TC

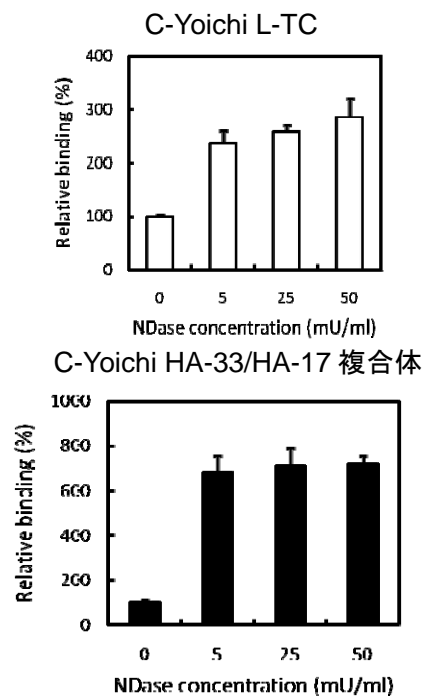


図 2. C-Yoichi L-TC および HA-33/HA-17 複合体のノイラミナーゼ処理したラット小腸上皮株化細胞 (IEC-6) への結合
37°C の CO₂ インキュベーター中で IEC-6 を図に示す濃度のノイラミナーゼを用いて 18 時間反応させた後、4°C において 100 nM の L-TC あるいは HA-33/HA-17 複合体 を添加し 1 時間インキュベートした。細胞溶解産物を SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロットにより検出したバンド強度をデンストメトリック解析した。図中に示す棒グラフは、ノイラミナーゼ未処理の細胞に対する結合を 100 % として表示した。実験は 3 連で行った。

同様に小腸上皮株化細胞（ラット由来：IEC-6）への結合活性も細胞のノイラミダーゼ処理によって、顕著に上昇した（図2）。また、IEC-6細胞への結合は、HA-33/HA-17複合体のみでも見られたことから、C-Yoichi L-TCの細胞への結合はHA-33/HA-17複合体を介して生じることが示された（図2）。さらに、C-Yoichi L-TC および HA-33/HA-17 複合体の IEC-6 細胞への結合は、ガラクトース、ラクトースおよび N-アセチルガラクトサミンの存在により阻害された（図3）。

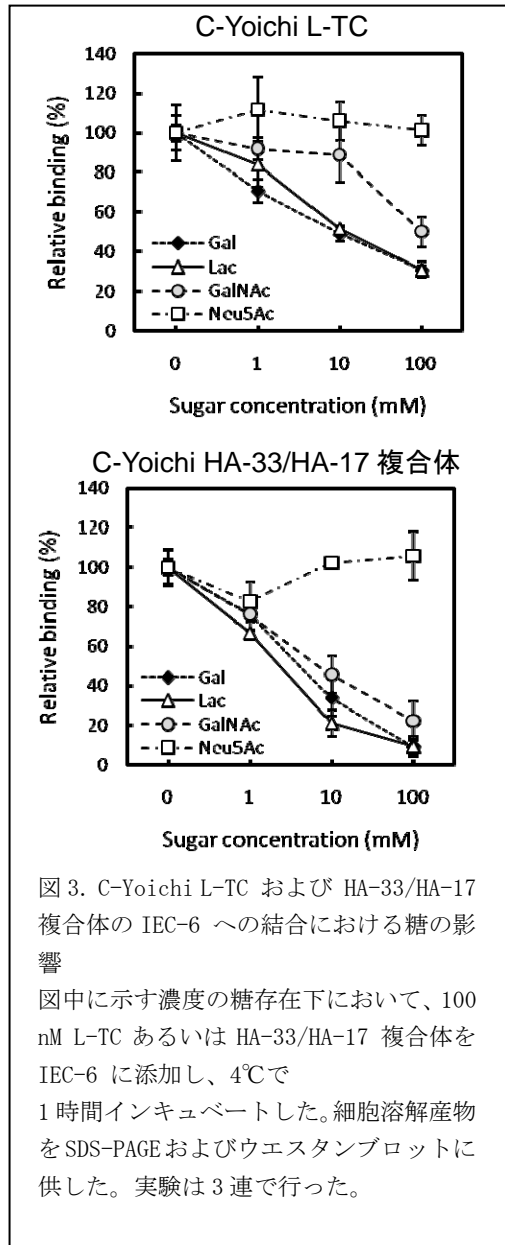


図3. C-Yoichi L-TC および HA-33/HA-17 複合体の IEC-6 への結合における糖の影響

図中に示す濃度の糖存在下において、100 nM L-TC あるいは HA-33/HA-17 複合体を IEC-6 に添加し、4℃で1時間インキュベートした。細胞溶解産物を SDS-PAGE およびウエスタンブロットに供した。実験は3連で行った。

以上の結果、著者らは、HA-33 に変異をもつ C-Yoichi L-TC の小腸上皮細胞への結合は、他の C および D 型 L-TC と異なり、糖鎖末端のガラクトースを介して生じることを初め

て示した。

(2) NTNHA タンパク質の細胞結合および毒素複体のうち、NTNHA タンパク質は経口的に投与されたときに消化液から神経毒素を保護する機能があると考えられていた。しかし、本研究では、NTNHA タンパク質が単独でも小腸上皮細胞へ結合し、透過することを初めて明らかにした。

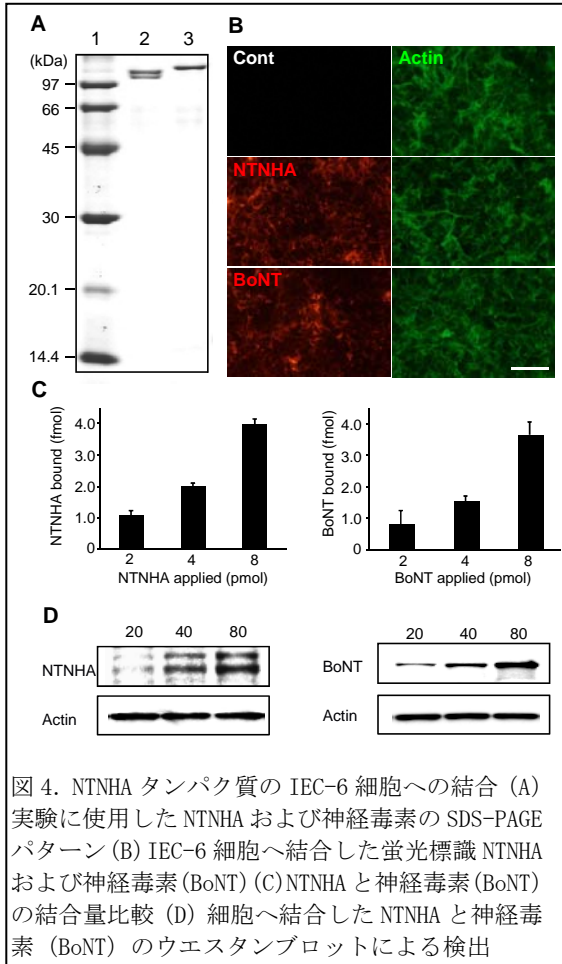


図4. NTNHA タンパク質の IEC-6 細胞への結合 (A) 実験に使用した NTNHA および神経毒素の SDS-PAGE パターン (B) IEC-6 細胞へ結合した蛍光標識 NTNHA および神経毒素 (BoNT) (C) NTNHA と神経毒素 (BoNT) の結合量比較 (D) 細胞へ結合した NTNHA と神経毒素 (BoNT) のウエスタンブロットによる検出

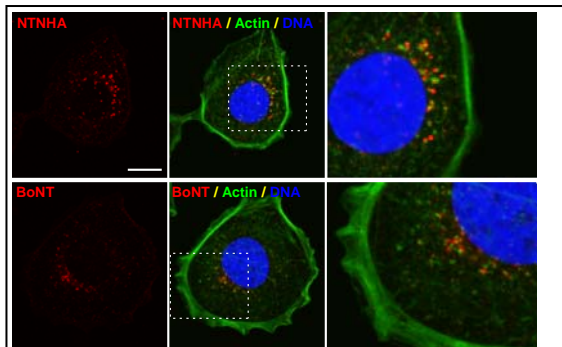


図5. NTNHA タンパク質の IEC-6 細胞への取り込み 蛍光標識したそれぞれのタンパク質は、IEC-6 細胞内へ取り込まれることが観察された。

M-TC (神経毒素/NTNHA 複合体) から、神経毒素および NTNHA を精製し、それぞれを Cy3 で蛍光標識した。それぞれのタンパク質を培養細胞へ加えたところ、いずれのタンパク質も細胞表面へ結合した (図 4B)。また、その結合量は濃度依存的な結合であった (図 4C, D)。

また、図 5 に示すように、NTNHA タンパク質は IEC-6 細胞内に取り込まれる様子が観察された。興味深いことに、細胞内で観察された NTNHA タンパク質は、アクチンと共存しており、アクチン依存的に細胞内を移動している可能性が示された。

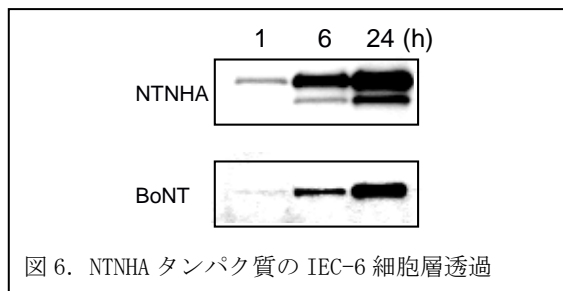


図 6. NTNHA タンパク質の IEC-6 細胞層透過

さらに、NTNHA タンパク質は細胞層上部から下部へと時間依存的に移動していることが観察された (図 6)。以上の結果から、NTNHA タンパク質が神経毒素タンパク質と同様に細胞層を透過することが初めて明らかとなった。

(3) HA-33 および NTNHA と相互作用する小腸上皮細胞膜上のタンパク質の検出

ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit (M-PEK; Merck Novagen®)、あるいは ProteoExtract® Native Transmembrane Protein Extraction Kit (TM-PEK; Merck Novagen®) によって抽出した膜タンパク質画分に rHA-33 標品を添加して Pull-down assay を行い、SDS-PAGE によって検出した (図 7)。また、rNTNHA を IEC-6 に結合させた後、界面活性剤の SDC を用いて可溶化し、rNTNHA と相互作用する細胞上のタンパク質を SDS-PAGE によって検出した (図 8)。

この結果、図中の矢印に示す位置に、受容体と考えられるタンパク質が検出された。今後、これらのタンパク質を N 末端アミノ酸配列解析に供し、特定を試みる。

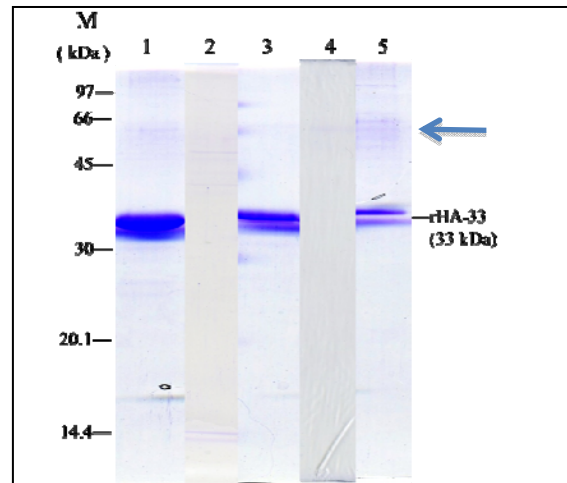


図 7. rHA-33 と相互作用する小腸上皮細胞膜上タンパク質の Pull-down assay

M-PEK および TM-PEK を用いて膜タンパク質を抽出後、rHA-33 と結合させ、Dynabeads で Pull-down assay した結果を示す。1. rHA-33 のみ、2. M-PEK で抽出した膜タンパク質のみ、3. M-PEK 抽出液と rHA-33 を結合、4. TM-PEK で抽出した膜タンパク質のみ、5. TM-PEK 抽出液と rHA-33 を結合させたサンプル

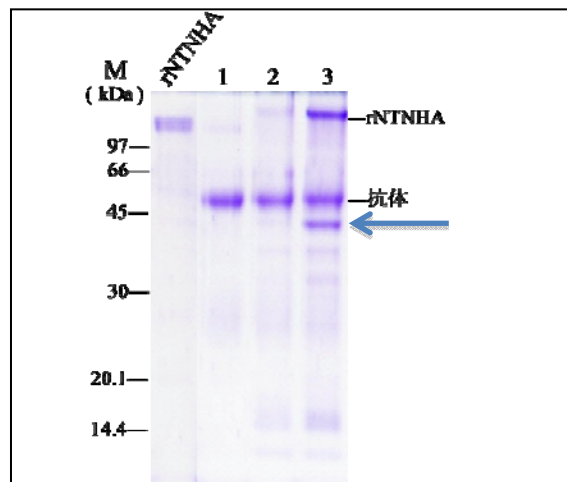


図 8. rNTNHA と相互作用する小腸上皮細胞膜上タンパク質の Pull-down assay

0.15 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) および界面活性剤 SDC を用いて、免疫沈降を行った結果を示す。

1. rNTNHA のみを免疫沈降 2. 細胞のみを免疫沈降
3. 細胞に rNTNHA を結合させ、免疫沈降させたサンプルの SDS-PAGE バンドパターン。40 kDa 付近に受容体タンパク質の可能性のあるバンドが検出された。

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 7 件)

1. Matsuo, T., Miyata, K., …Niwa, K (9 番)., Watanabe, T (10 番)., Ohyama, T (11 番). 11 人中 (2011). Characterization of sugar recognition by the toxin complex produced by the *Clostridium botulinum* serotype C variant strain Yoichi. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63(1), 35-43. 査読あり
doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00825.x

2. Ito, H., Sagane, Y., …Niwa, K (12 番目)., Ohyama, T (13 番目)., Watanabe, T (14 番目). 14 人中 (2011). HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61(3), 323-331. 査読あり
doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00779.x
(他 5 件)

[学会発表] (計 27 件)

1. 宮下慎一郎, 相根義昌, 犬井健, 栗原小百合, 鈴木智典, 丹羽光一, 渡部俊弘. ボツリヌス神経毒素結合タンパク質 非毒非血球凝集素の小腸上皮細胞への結合および透過機構. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 18~20 日. 千葉

2. 宮下慎一郎, 相根義昌, 犬井健, 栗原小百合, 狩野聡史, 林慎太郎, 川根武紘, 鈴木智典, 丹羽光一, 渡部俊弘. ボツリヌス神経毒素結合タンパク質-非毒非血球凝集素の小腸上皮細胞層への結合および透過機構. 第 85 回日本生化学会大会. 2012 年 12 月 14~16 日. 福岡

3. Miyashita, S. -I., Sagane, Y., Miyata, K., Inui, K., Kurihara, S., Kano, S., Hayashi, S., Kawane, T., Suzuki, T., Niwa, K., and Watanabe, T. 2012. Transport of the botulinum neurotoxin-associating protein, nontoxic nonhemagglutinin, across the intestinal epithelial cell layer. 22nd IUBMB and 37th FEBS. September 4-9, Seville, Spain.

4. 宮下慎一郎, 相根義昌, 宮田恵多, 犬井健, 栗原小百合, 狩野聡史, 林慎太郎, 川根武紘, 鈴木智典, 丹羽光一, 渡部俊弘. ボツリヌス神経毒素結合タンパク質非毒非血球凝集素の小腸上皮細胞への結合および透過. 第 79 回日本細菌学会北海道支部会学術総会.

2012 年 8 月 28~29 日. 帯広

5. 犬井 健, 宮田恵多, 伊藤博章, 松尾 5, 堀内亮太, 吉田悠真, 宮下慎一郎, 村松将司, 渡部俊弘, 大山 徹, 丹羽光一. C 型ボツリヌス毒素の小腸上皮細胞からの侵入機構の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会代 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010 年 12 月 7~10 日, 神戸

6. 丹羽光一, 伊藤博章, 犬井 健, 宮田恵多, 松尾智仁, 堀内亮太, 宮下慎一郎, 吉田悠真, 村松将司, 渡部俊弘, 大山 徹. C 型および D 型ボツリヌス毒素の小腸上皮細胞の透過におけるシアル酸の役割. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 9 月 16~18 日, 帯広
(他 21 件)

[図書] (計 1 件)

Sagane, Y., Inui, K., Miyashita, S. -I., Miyata, K., Suzuki, T., Niwa, K., and Watanabe, T. 2012. Botulinum toxin complex: a delivery vehicle of botulinum neurotoxin traveling digestive tract. *Structure and function of food engineering*. Ayman Amer Eissa (Ed.), Intech, Croatia, pp. 137-150.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

生物化学研究室ホームページ

<http://www.bioindustry.nodai.ac.jp/~seika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 俊弘 (WATANABE TOSHIHIRO)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号: 80175695

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

大山 徹 (OOYAMA TORU)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号: 60318178
丹羽 光一 (NIWA KOICHI)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号: 20301012