

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860320

研究課題名(和文)ボツリヌス菌が産生するHAの構造と毒素の腸管吸収機構に関する研究

研究課題名(英文)Study for structure and function of botulinum hemagglutinin

研究代表者

鈴木 智典 (Suzuki, Tomonori)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：90453836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)が産生するボツリヌス毒素は、神経毒素タンパク質に4種の無毒タンパク質群が結合した巨大な複合体構造を形成している。無毒タンパク質のうち、血球凝集素(hemagglutinin; HA)は腸管細胞への吸着や透過に重要とされている。また、HAは3種のサブコンポーネントで構成されている。本研究では、HAサブコンポーネント間の相互作用部位やHA構造について研究した。

研究成果の概要(英文)：The large toxin complex (L-TC) produced by *Clostridium botulinum* is formed from neurotoxin and four non-toxic proteins. In particular, HA components appear to play a role in the transport of the TC across the intestinal epithelium. In this study, the binding regions between HA subcomponents were examined.

研究分野：細菌学、生物化学

キーワード：Clostridium botulinum 毒素複合体 ボツリヌス毒素 血球凝集素 タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、食中毒の原因ともなる致死性のボツリヌス毒素を産生し、その神経毒素タンパク質 (Botulinum neurotoxin; BoNT, 150 kDa) の血清型から、A~G 型の 7 型に分類される。経口摂取された BoNT は消化管を經由して最終的に神経・筋接合部に到達し、シナプス小胞の融合を遮断して神経伝達物質の放出を阻害する。この一連の過程がヒトや動物に神経麻痺を引き起こし、死に至ると考えられている。

自然界や培養液中で BoNT は無毒なタンパク質群と結合し巨大な毒素複合体 (M, L, LL) を形成している。BoNT に非毒非血球凝集素 (Nontoxic nonhemagglutinin; NTNH, 130 kDa) が結合して M 毒素となり、さらに血球凝集素 (Hemagglutinin; HA) が結合して L 毒素や LL 毒素 (L 毒素の 2 量体) が形成される。また HA は HA-33, HA-17, HA-70 (各々, 33, 17, 70 kDa) という 3 種のサブユニットから構成されている¹⁾。

近年、ボツリヌス毒素の吸収機構が争点になっている²⁻⁵⁾。細胞への結合や透過性には HA が強く関与していることが示唆されており、筆者は共同研究者らと共に毒素の構造や腸管細胞への結合性・透過性に関する研究を行い、薬物送達システムに応用しようという研究を進めている⁶⁻⁸⁾。安全かつ効果的な創薬を行うためには、HA の構造と機能の解明が必須である。しかし、L 毒素は非常に巨大かつ複雑な構造ゆえ結晶構造解析が困難であり、HA 複合体構造も同様に未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、HA の複合体構造と機能を解析し、L 毒素の立体構造の大部分を明らかにすることを旨とする。ボツリヌス毒素の構造と機能を理解する上で重要な知見を得ることで、医療等への毒素の応用につながることを期待できる。

3. 研究の方法

(1) 毒素複合体および HA の精製

従前の方法に従い、ボツリヌス D 型菌 4947 株を培養し、培養液から L 毒素の精製および HA の単離精製を行った⁹⁻¹²⁾。

(2) Far-western blotting

単離した HA-70 および *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼをタンパク質比で 100:1 になるように混合し、インキュベートした (37 °C, 10 分間)。未処理の HA-70 およびプロテアーゼ処理した HA-70 を SDS-PAGE し、PVDF 膜にエレクトロブロットングした。PVDF 膜をスキムミルク溶液 (10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 10% skim milk and 0.05% Tween-20) でブロッキングした (室温, 4 時間)。その後、プローブとして HA-33/HA-17 を添加してインキュベートした (室温, 一晩)。PVDF 膜をブロッ

キング溶液で洗浄した後、0.5% ホルマリン PBS に浸けてインキュベートし (室温, 30 分間)、2% グリシン PBS でホルマリンを除去するための洗浄を行った (室温, 10 分間)。PVDF 膜をブロッキング溶液でリンスした後、HA-33/HA-17 抗体と反応させた (室温, 1 時間)。PBS で洗浄した後、二次抗体としてウサギ IgG-HRP 抗体を反応させ (室温, 1 時間)、POD Immunostain Set (Wako) で検出を行った。

(3) N 末端アミノ酸配列解析

SDS-PAGE 後の PVDF 膜への転写は既報の方法に従って行った¹³⁾。タンパク質の N 末端アミノ酸配列はプロテインシーケンサー (model 492HT; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で分析した。

(4) ホモロジーモデリングおよびドッキングシミュレーション

D-4947 HA-70 の構造モデルは Discovery Studio v3.1 (Accelrys Software Inc., San Diego, CA) でホモロジーモデリングした。鋳型構造には C 型 HA-70 (PDB ID: 4EN6) を使用した。構造のエネルギー最小化後に Swiss-PdbViewer ver. 3.9b2 (available at <http://swissmodel.expasy.org/spdbv/>) での Ramachandran plot でモデル構造の妥当性を検証した。

HA-70/HA-33/HA-17 複合体構造モデルは、ZDOCK を用いたドッキングシミュレーションによって予測した¹⁴⁾。HA-33/HA-17 構造は X 線結晶構造データを用いた (PDB ID: 2E4M)。シミュレーションの前処理として、HA-70 の C 末端領域 (Glu367~Ser623) が HA-17 との相互作用領域となるようマスキング処理を行った。予測された複合体構造は、ZDOCK のスコアリングおよび Far-western blot の結果から候補構造を選出した。立体構造は Discovery Studio Visualizer (Accelrys Software Inc.) を用いて可視化した。

4. 研究成果

(1) PVDF 膜上の HA-70 に対する HA-33/HA-17 の結合試験

D-4947 の培養上清から精製した L 毒素は、BoNT, NTNHA, HA-70, HA-33, HA-17 の 5 つのサブユニットから構成されており (図 1A)、SDS-PAGE することでそれぞれ 150 kDa, 130 kDa, 70 kDa, 33 kDa, 17 kDa のバンドとして観察される (図 1B, レーン 1)。HA-33/HA-17 抗体を用いた Western blot を行うと、抗体は PVDF 膜上の HA-33 および HA-17 と特異的に反応する (図 1B, レーン 2)。次に、HA-33/HA-17 をプローブタンパク質とした Far western blot を行った。その結果、HA-33 および HA-17 のバンド以外に、HA-70 のバンドも検出された (図 1B, レーン 3)。一方で、BoNT や NTNHA は検出されていない。これらのことから、HA-33/HA-17 を用いた Far-western blot は、PVDF 膜上の HA-70 に

HA-33/HA-17 が結合し、それに HA-33/HA-17 抗体が特異的に反応していると考えられる。Mutoh らは、HA-70 と HA-33 の間に結合は認められないことを報告している¹⁰⁾。したがって、HA-70 は HA-17 と結合していると考えられる。

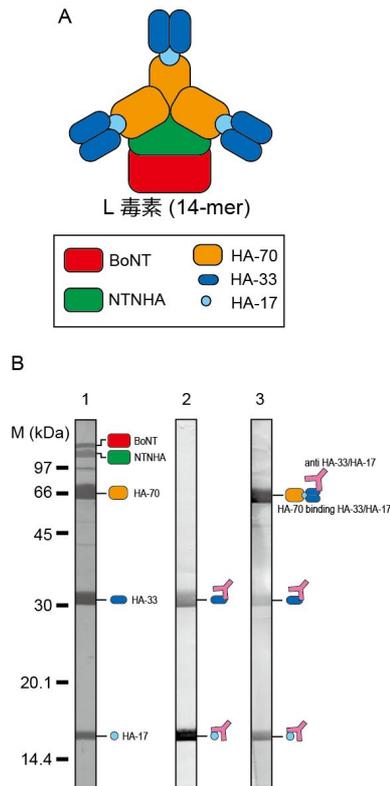


図 1. L 毒素のサブユニット構造モデル (A) と HA-33/HA-17 をプローブとした Far western blot の結果 (B)

(2) V8 プロテアーゼ処理した HA-70 断片に対する HA-33/HA-17 の結合試験

HA-70 と HA-17 の相互作用部位を同定するために、HA-70 消化断片と HA-33/HA-17 の相互作用を Far-western blot によって解析した。L 毒素から単離した HA-70 を V8 プロテアーゼ処理し、SDS-PAGE を行い PVDF 膜へ転写した。PVDF 膜を CBB 染色すると HA-70 断片である 17 バンド観察された (図 2A, レーン 2)。これを HA-33/HA-17 抗体を用いた通常の Western blot 解析を行った場合、バンドは検出されなかった (図 2A, レーン 1)。しかし、HA-33/HA-17 プローブタンパク質で処理し HA-33/HA-17 抗体で検出する Far-western blot 解析を行った結果、10 バンドが検出された (図 2A, レーン 3)。これら 10 バンドを含む 17 バンドの N 末端アミノ酸配列分析を行った。N 末端アミノ酸配列、各バンドの分子量および V8 プロテアーゼの切断部位特異性 (Glu のカルボニル側) から、17 バンドは図 2B の模式図に示すような断片であると推定された。図に示したように、HA-70

の C 末端側のおよそ半分の領域には HA-33/HA-17 が結合しなかった。この結果は、Kouguchi らが C-6814 株培養液中に HA-70 の 35~38 kDa C 末端領域断片に HA-33 および HA-17 が結合した複合体の存在を報告したことと一致する¹²⁾。C-6814 および D-4947 の HA-70 は 99% で配列が一致しており、D 型 HA-70 の C 末端領域も L 毒素形成に重要であるといえる。

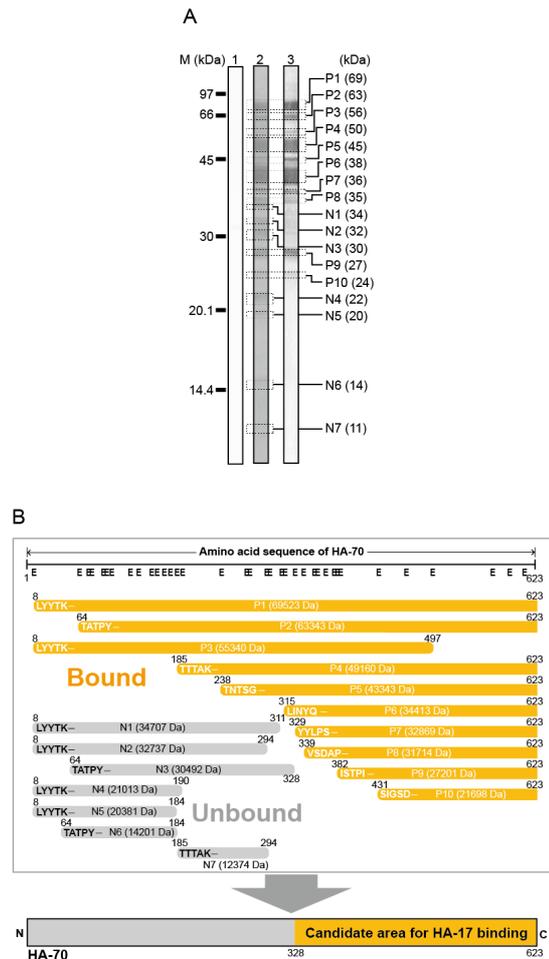


図 2. HA-70 の V8 プロテアーゼ消化断片に対する HA-33/HA-17 をプローブとした Far western blot の結果 (A) と HA-70 全長に対する HA-70 断片の位置および分子量を示した模式図 (B)

(3) HA-70 および HA-33/HA-17 のドッキングシミュレーション

D 型 HA-70 の構造を、立体構造が既知の C 型 HA-70 を鋳型としてホモロジーモデリング法によって予測した。Ramachandran plot による検証では、モデリングした D 型 HA-70 構造の favored region は 88.3%, additionally allowed region は 8.1% となり、構造の妥当性が示された。

HA-70 および HA-17 の結合部位を予測するために ZDOCK プログラムを用いたドッキングシミュレーションを行った¹⁴⁾。Far-western blot 解析の結果および Mutoh らの報告した

HA-17がHA-70と結合しているという報告¹⁰⁾に基づいて、HA-70のC末端領域(Glu367～Ser623)およびHA-17の全領域を結合可能な領域として複合体構造予測計算を行った。図3に示したように、HA-17のPhe7, Lys46, Ser51, Ser52, Asn65, Ser82, Asn83とHA-70のGln420, Asn421, Glu464, Thr539, Phe544, Thr569, Glu570, Thr575と相互作用していると予測された。近年、LeeらはA型毒素の結晶構造解析においてHA-17とHA-70のC末端領域における相互作用を報告しており、今回の結果と一致するものである¹³⁾。しかし、その報告における相互作用に関わる残基は、HA-17のIle18, Arg54, Lys91, Ile92, Ala93, Val94, Thr96, Glu119, Ser137, Met140, Lys142およびHA-70のAsn546, Phe547, Asn549, Lys550, Arg570, Glu573, Ile575, Asp576, Gly601であり、今回のD型HA-70/HA-17における相互作用部位の特徴とは異なる。この相違は、D型HAとA型HAの構造の違いによるもの、もしくは、予測の間違いによる可能性も考えられる。今後、変異体を用いた実験などによって検証していく必要があると思われるが、今回の結果はボツリヌス毒素の三次元立体構造を理解する上で重要な知見になり得るものと思われる。

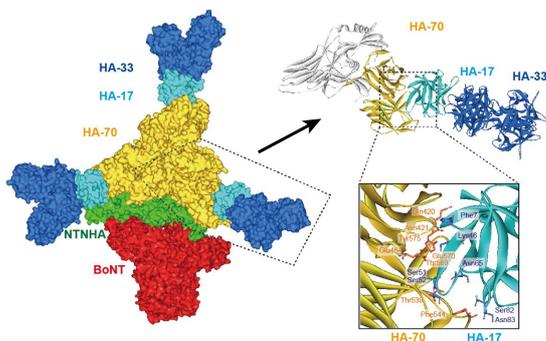


図3. HA-70/HA-17のドッキングシミュレーション結果および結合に関与すると推定されるアミノ酸残基(L毒素の全体像はHasegawaら⁸⁾の電子顕微鏡解析像を参考にしている)

参考文献

- 1) K. Oguma *et al.*, *J. Toxicol-Toxin Rev.*, **18**, 17-34, 1997.
- 2) T. Matsumura *et al.*, *Cell Microbiol.*, **10**, 355-364, 2008.
- 3) Y. Jin *et al.*, *Microbiol.*, **155**, 35-45, 2009.
- 4) A. Couesnon *et al.*, *Cell Microbiol.*, **11**, 289-308, 2009.
- 5) Y. Sugawara *et al.*, *J. Cell Biol.*, **189**, 691-700, 2010.
- 6) H. Ito *et al.*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **61**, 323-331, 2011.
- 7) T. Suzuki *et al.*, *Microbiology*, **151**,

1475-1483, 2005.

- 8) K. Hasegawa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **282**, 24777-24783, 2007.
- 9) H. Kouguchi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 2650-2656, 2002.
- 10) S. Mutoh *et al.*, *Biochemistry*, **42**, 10991-10997, 2003.
- 11) H. Kouguchi *et al.*, *Jpn. J. Electrochem.* **44**, 27-34, 2000.
- 12) H. Kouguchi *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **268**, 4019-4026, 2001.
- 13) H. Hirano and T. Watanabe, *Electrophoresis*, **11**, 573-580, 1990.
- 14) R. Chen and Z. Weng, *Proteins* **47**, 281-294, 2002.
- 15) K. Lee *et al.*, *PLoS Pathog.* **9**, e1003690, 2013.

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2件)

Suzuki T, Miyashita S, Hayashi S, Miyata K, Inui K, Kondo Y, Miyazaki S, Ohshima T, Niwa K, Watanabe T, Sagane Y., Identification of the interaction region between hemagglutinin components of the botulinum toxin complex, *International Journal of Biological Macromolecules*, 65: 284-288, 2014. (査読あり)

Sakaguchi Y, Suzuki T, Yamamoto Y, Nishikawa A, Oguma K., Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains, *Research in Microbiology*, 166: 318-325, 2015. (査読あり)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計1件)

小熊恵二, 山本由弥子, 鈴木智典, 医薬ジャーナル社, 人獣共通感染症 改訂3版 細菌性人獣共通感染症 ボツリヌス症, 2016, pp. 280-296

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 智典 (Suzuki, Tomonori)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号: 90453836