

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08475

研究課題名(和文) ボツリヌス食中毒の消化器傷害におけるボツリヌス毒素複合体無毒タンパク質の関与

研究課題名(英文) Involvement of nontoxic protein in botulinum toxin complex on digestive injury in botulism food poisoning

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス神経毒素(BoNT)は、筋肉の麻痺を引き起こす。しかし、ボツリヌス食中毒においては、胃腸障害や血管病変を引き起こすことがあり、その原因は不明である。一方、BoNTは、無毒タンパク質を会合し、毒素複合体を形成する。本研究では、無毒タンパク質の複合体がラット小腸上皮細胞に対し、細胞質内の空胞形成を伴う、細胞毒性を示すことを初めて明らかにした。本研究では、さらに、ボツリヌス毒素の無毒タンパク質複合体が、他の空胞化毒素とは異なるメカニズムで細胞内の空胞を形成することを明らかにした。本研究の成果は、まだ不明な点が多いボツリヌス中毒発症メカニズムの解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Botulinum neurotoxin (BoNT) causes muscle paralysis. Botulism food poisoning may cause gastrointestinal disorders and vascular lesions, and the cause of these symptoms is unclear. On the other hand, BoNT associates non-toxic proteins and forms a toxin complex. In this study, for the first time, we demonstrated that a nontoxic protein complex shows cytotoxicity, accompanied by formation of vacuoles within the cytoplasm, to rat small intestinal epithelial cells. In this study, furthermore, it was revealed that the nontoxic protein complex of botulinum toxin forms vacuoles within the cell by a mechanism different from other vacuolating toxins. The results of this research are expected to lead to the elucidation of the mechanism of botulism intoxication, which is still unclear.

研究分野：タンパク質化学

キーワード：ボツリヌス食中毒 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) はボツリヌス菌が産生するタンパク質毒素である。ボツリヌス毒素は自然界で最も毒性が高く、致死性の神経疾患を引き起こす。BoNT は抗原性の差異により A~G 型に分類され、ヒトには主に A、B、E、F 型 BoNT、ウシなどの家畜では主に C、D 型 BoNT による中毒が報告されている。

BoNT は自然界では、無毒タンパク質複合体 (Nontoxic-protein complex; NC) と結合した毒素複合体として存在する (図 1)。NC は、非毒非血球凝集素 (NTNHA) および血球凝集素 (HAS) から構成され、BoNT を効果的に神経細胞まで送達する機能がある (Ito et al, 2011)。経口的に摂取された毒素複合体は小腸上皮細胞から吸収され、最終的に神経筋接合部に到達する。

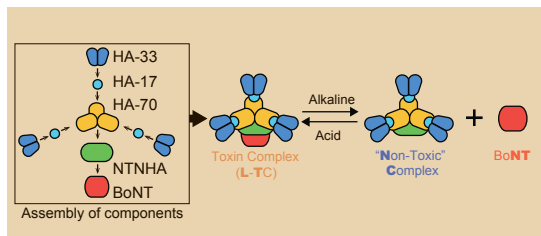


図 1. ボツリヌス毒素複合体

ヒトボツリヌス症では、初期症状として下痢や嘔吐など消化器への異常が見られる。現在のところ、これらの症状の原因は、ボツリヌス毒素に起因するものではなく、混合感染した他の菌などの影響と考えられているが詳細は不明のままである。また、ウシボツリヌス症でも小腸や血管に病変が見られているが、これも他の菌が関与しているものと考えられており原因は明らかにされていない。申請者らは、ボツリヌス NC が、胃の細胞に空胞化および細胞死をもたらすピロリ菌由来の VacA 毒素と同様に pore 構造を有することから、ボツリヌス NC が細胞に対し何らかの毒性を示すものと予測し、予備的な試験を試みた。その結果、D 型菌の NC がラット小腸上皮株化細胞 IEC-6 を細胞死させること、また VacA 毒素様の空胞を形成することを明らかにした。このことから申請者は、NC は BoNT を送達するだけでなく、それ自身に VacA と同様の細胞毒性があり、ボツリヌス症における胃腸障害や血管病変などの症状と何らかの関与があるものと推測した。

2. 研究の目的

ボツリヌス食中毒の主な症状は神経毒素 (BoNT) による筋肉麻痺である。しかし、胃腸障害や血管病変を引き起こすことがあり、その原因は現在のところ不明である。一方、BoNT は、自然界において、無毒タンパク質複合体 (NC) と結合し、毒素複合体を形成する。先に、我々は NC の立体構造が胃の

細胞に障害をもたらす VacA 毒素と類似していることを見出し、NC が VacA 同様の細胞毒性を示すものと予測した。そして、NC が実際に腸管上皮や血管内皮培養細胞に空胞を形成し、細胞毒性を示すことを明らかにした。本研究では、NC による細胞毒性のメカニズムを解明し、NC と胃腸障害や血管病変との関連性を明らかにする。

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 B 型菌 Lammana 株 (B-Lammana) C 型菌 Stockholm 株 (C-St) および D 型菌 4947 株 (D-4947) 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) 細胞培養

本研究で用いた細胞は、ラット小腸上皮細胞株 (IEC-6) である。細胞の培養は、それぞれ常法にしたがい行った。

(3) 細胞毒性および細胞生存率の計測

細胞を、96 ウェル培養プレート (Corning) において培養した。培養 1 日後、細胞 10% FBS を含有する DMEM で洗浄し、試験試料を含む 100 μ L の培地中で 24 時間インキュベートした。Cytotoxicity detection kit (LDH; Roche) を用いて細胞毒性を評価した。一方、細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 (CCK-8,) を用いて測定した。

(4) 免疫染色

8 穴 Lab-Tek Chamber Slide に細胞を播種し、細胞を定着させた。次いで、細胞を、50nM 毒素複合体の存在下または非存在下において、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。細胞は、室温で 15 分間 4%ホルムアルデヒドで固定し、0.3%Triton-X-100 および 5%ヤギ血清 (Wako) を含む PBS で RT、1 時間ブロックした。次に、細胞を、0.3%Triton-X を含有する PBS 中で 1 : 200 (EEA1 および Rab5)、1 : 100 (Rab7、Rab9 Rab11、GM130 および Lamp1) または 1:50 (Calnexin) に希釈した一次抗体とともにインキュベートした。二次抗体として Alexa Fluor 647 ヤギ抗ウサギまたは抗マウス IgG 抗体を、0.3%Triton-X-100 および 1%BSA を含む PBS 中で RT、1 時間静置した。DAPI (Life Science Technology) を含む ProLong Diamond とともにをスライドガラス上に載せ、レーザー共焦点顕微鏡下で観察した。

(5) ラット小腸における傷害試験

すべての動物実験プロトコールは、日本学術会議が公布した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」と東京農業大学の実験

動物委員会の認可を受けた。本実験では、雄 Sprague-Dawley ラット (7~10 週齢) を使用した。ラットは絶食し、水は、自由に摂取させた。12 時間後、PBS に溶解した無毒タンパク質複合体を、経口カテーテル (200 μ g/100g 体重) を介してラットの胃に投与した。24 時間後に投与を繰り返した。さらに 12 時間後、ラットを適切な手法で絶命させ、幽門から 25~30cm に位置する空腸の部分を除去了。組織を 4%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。切片 (厚さ 4 μ m) を切断し、再水和し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。粘膜を顕微鏡 (Zeiss Axiovert 40 CFL) で観察した。

4. 研究成果

(1) D 型「無毒」タンパク質複合体による細胞毒性と腸管への傷害活性

ボツリヌス C および D 型菌によって産生された毒素複合体 (LT)、BoNT、および無毒タンパク質複合体 (NC) の細胞傷害性を IEC-6 ラット腸管上皮細胞において試験した。図 2 に示すように、生存細胞の数は、L-TC および NC の存在下において、濃度依存的に減少した。さらに、細胞内の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の漏出は、L-TC および NC の添加により増加した (図 3)。一方で、BoNT は生存細胞数および LDH の漏出に影響しなかった (図 2 および 3)。これらの結果は、BoNT ではなく L-TC の NC が IEC-6 細胞における細胞死を誘導することを示唆している。一方、B 型由来 L-TC は IEC-6 に対して細胞毒性を示さなかった。C および D 型 NC の構成成分は、高いレベルのアミノ酸配列類似性 (87~97% 同一性) を示す。したがって、以下の実験では、D 型 NC を使用した。

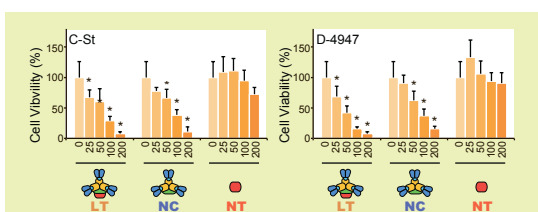


図 2. LT、NC および BoNT の細胞生存率への影響

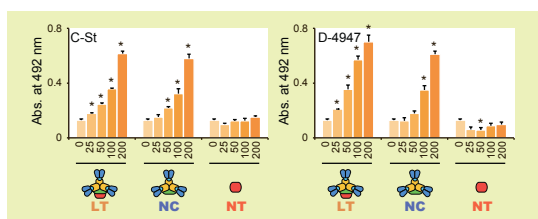


図 3. LT、NC および BoNT の細胞傷害性

NC が *in vivo* における腸管細胞に対して細胞傷害性効果を有するかどうかを明らか

にするために、ラットに NC を経口的に腸管内へ投与した。投与してから 36 時間後、空腸組織切片をラットから調製した。その結果、NC で処理したラットでは、空腸上皮細胞が剥離し、絨毛上部の粘膜表面の著しい破壊を示した (図 4)。したがって、今までは無毒であると考えられていた NC が *in vivo* においても細胞毒性を有することが示唆された。

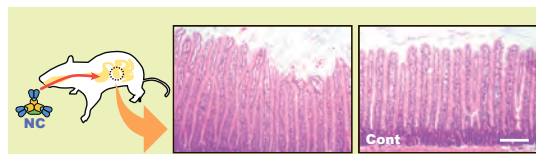


図 4. *in vivo* における NC の腸管への影響

(2) NC による細胞の形態変化と空胞の形成

図 5 に示すように、IEC-6 細胞を NC に晒すと、細胞質において空胞の形成が誘導された。その一方で、BoNT で処理しても細胞内に空胞は形成されなかった。また、図 5 に示すように、NC は、空胞内部に侵入するのではなく、空胞の周辺を取り囲んでいることから、オートファジー作用による NC の分解現象ではないことを示している。

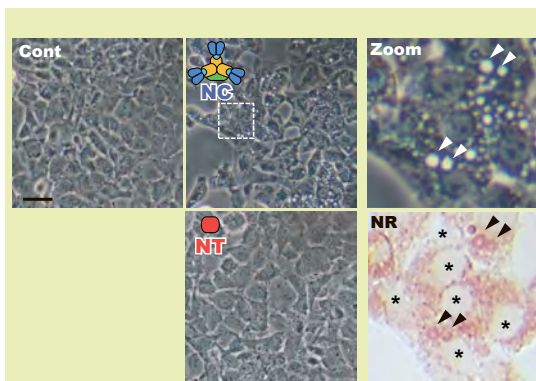


図 5. NC 添加によって引き起こされた細胞内空胞

(3) NC によって形成される空胞の起源

次に、NC によって誘導された空胞の起源を明らかにするために、NC による空胞化が発生した細胞内の Rab GTPase およびマーカータンパク質を免疫染色した。抗 Rab7 を用いた免疫染色では、空胞を取り囲むようにシグナルを生じた (図 6 上)。また、抗 Rab9 染色の際にも、いくつかの空胞がシグナルを示した (図 6 中)。Rab7 および Rab9 GTPアーゼは、後期エンドソームに特異的であるが、異なる生物学的機能を有する。さらに、免疫染色は、すべての液胞が、後期エンドソームおよびリソソームに関連するリソソーム関連膜タンパク質 1 (LAMP1) によって取り囲まれていることを示した (図 6 下)。一方、初期エンドソーム特異的 EEA-1 および Rab5、リサイクルエンドソーム特異的 Rab11、ゴルジ特異的 GM130、および小胞体特異的カルネ

キシンの共局在は観察されなかった (data not shown)。したがって、免疫染色の結果は、NC が後期エンドソームおよびリソソームと選択的に会合し、空胞の形成をもたらすことを示唆した。

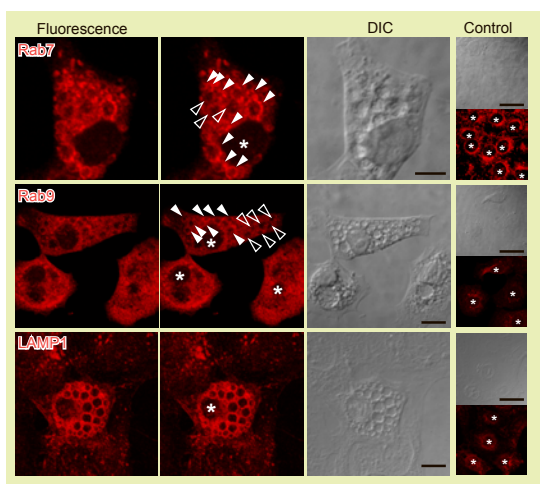


図 6. NC によって生じた空胞と Rab GTPase および LAMP1 との共局在

〈引用文献〉

Ito H, Sagane Y, Miyata K et al., HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer. FEMS Immunology & Medical Microbiology. Vol. 61, No. 3, 323-331

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 6 件)

① Sagane, Y., Mutoh, S., Koizumi, R., Suzuki, T., Miyashita, S. -I., Miyata, K., Ohya, T., Niwa, K., Watanabe, T. (2017). Reversible association of the hemagglutinin subcomplex, HA-33/HA-17 trimer, with the botulinum toxin complex. Protein J. 36, pp. 417-424. [査読あり]

② Suzuki, T., Sagane, Y., Matsumoto, T., Hasegawa, K., Yamano, A., Niwa, K., Watanabe, T. (2017). Building-block architecture of botulinum toxin complex: conformational changes provide insights into the hemagglutination ability of the complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 476, pp. 67-71. [査読あり]

③ Sagane, Y., Ito, M., Miyata, K., Suzuki, T., Niwa, K., Oguri, S., Watanabe, T. (2016). Data describing inhibitory profiles of sugars against hemagglutination by the botulinum toxin

complex of Clostridium botulinum serotypes C and D. Data Brief 9, pp. 413-416. [査読あり]

④ Sagane, Y., Hayashi, S., Akiyama, T., Matsumoto, T., Hasegawa, K., Yamano, A., Suzuki, T., Niwa, K., Watanabe, T., Yajima, S. (2016). Conformational divergence in the HA-33/HA-17 trimer of serotype C and D botulinum toxin complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 476, pp. 280-285. [査読あり]

⑤ Miyashita, S. -I., Sagane, Y., Suzuki, T., Matsumoto, T., Niwa, K., Watanabe, T. (2015) “Non-Toxic” proteins of the botulinum toxin complex exert in-vivo toxicity. Sci. Rep. 6, pp. 31043. [査読あり]

⑥ Miyata, K., Suzuki, T., Hayashi, S., Miyashita, S. -I., Ohya, T., Niwa, K., Watanabe, T., Sagane, Y. (2015). Hemagglutinin gene shuffling among Clostridium botulinum serotypes C and D yields distinct sugar recognition of the botulinum toxin complex. FEMS Path. Dis. 73, pp. ftv045 [査読あり]

[学会発表] (計 2 件)

① Sagane, Y., Miyashita, S. -I., Hosoya, K., Karatsu, S., Kurihara, A., Sugawara, C., Niwa, K., Watanabe, T. (2017). Internalization and intercellular trafficking of the serotype D botulinum neurotoxin binding protein, nontoxic nonhemagglutinin, in epithelial and endothelial cells. 10th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia. Ann Arbor, U. S. A.

② Sagane, Y., Miyashita, S. -I., Kurihara, A., Sugawara, C., Hosoya, K., Karatsu, S., Niwa, K., Watanabe, T. (2017). “Non-toxic” proteins of the botulinum toxin complex exert cytotoxicity with vacuole formation in the cell. 10th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia. Ann Arbor, U. S. A.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

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

武藤 信吾 (MUTOH, Shingo)
鎌倉女子大学・家政学部・講師
研究者番号：20749890

鈴木 智典 (SUZUKI, Tomonori)
東京農業大学・生命科学部・准教授
研究者番号：90453836

(4) 研究協力者

()