

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580364
 研究課題名 (和文) ボツリヌス感染症における腸管上皮細胞からの毒素タンパク侵入機構に関する研究
 研究課題名 (英文) Study on the invasion of botulinum toxin protein via intestinal epithelial cells in botulism.
 研究代表者
 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

研究成果の概要：家畜腸管からのボツリヌス毒素の吸収機構を明らかにするため、ラット小腸上皮細胞 IEC-6 を用いて、ボツリヌス D 型菌 4947 株が産生する 750 kDa 毒素複合体 (L-TC; 神経毒素と他の無毒タンパク複合体) の結合・透過に関する糖鎖を解析した。L-TC はその構成成分である HA-33 分子を介して小腸上皮細胞膜上の糖鎖であるシアル酸に結合して透過すること、また L-TC は神経毒素単独よりも効率よく細胞を透過することが明らかとなった。本研究から、給餌成分にシアル酸様の糖類を添加することで、ウシなどの家畜ボツリヌス症を予防できる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：ボツリヌス毒素、ボツリヌス症、小腸上皮細胞、獣医公衆衛生、病態生理学

1. 研究開始当初の背景

日本においてウシボツリヌス症が増加傾向にあり、その予防法の確立が望まれている。ボツリヌス症はボツリヌス菌が産生する神経毒素 (150 kDa, BoNT) による神経麻痺を主徴とし、BoNT は通常他の無毒タンパク質と会合した毒素複合体 (TC) として産生される。

TC が腸管上皮細胞の糖鎖に結合することが近年知られるようになった。しかし、この結合が実際に腸管からの吸収に直接繋がる

か否かは分かっていない。さらに、TC は BoNT のほか非毒非血球凝集素 (NTNHA)、および 3 種の血球凝集素 (HA) 成分 (HA-17、HA-33、HA-70) より構成されているが、このうちのどの成分が TC の結合・透過に寄与しているかは不明である。

2. 研究の目的

TC の小腸上皮細胞から血中への移行機序については未だ不明な点が多い。本研究では

以下の点を調べることでボツリヌス毒素複合体である L-TC (750 kDa) の腸管からの吸収機構を解明し、家畜ボツリヌス症予防法の開発に寄与することを目的とした。

(1) L-TC は小腸上皮細胞細胞膜上の糖鎖に結合して透過するのか、またその結合・透過に寄与する糖は何か

(2) L-TC の構成成分 HA (HA70、HA33、HA17) のうち小腸上皮細胞と結合するものは何か

3. 研究の方法

(1) ボツリヌス D 型菌 4947 株 (D-4947) を透析培養し、培養上清中の 750 kDa TC (L-TC) および 150 kDa BoNT をカラムクロマトグラフィーにより精製して用いた。

(2) ラット小腸上皮細胞株である IEC-6 を培養し、毒素の結合実験および透過試験を行った。透過試験は、IEC-6 をトランスウェルの多孔質膜上に播種し、膜を透過した毒素を回収して検出した (Fig. 1)。細胞同士がどの程度密に結合しているかを調べるために、専用のテスター (Millicell-ERS) を用いて細胞層を介した電気抵抗値 (TER) を測定した。

(3) 細胞に結合した毒素、およびトランスウェルで細胞層を透過した毒素は抗 BoNT 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出し、バンド強度を数値化した。

(4) 細胞に結合した毒素の可視化は、抗 BoNT 抗体および Alexa Fluor 488 標識二次抗体を用いて蛍光顕微鏡下で行った。

4. 研究成果

(1) 毒素の IEC-6 への結合

BoNT あるいは L-TC を細胞に播種し、4 日で 1 時間インキュベートして抗 BoNT 抗体および Alexa Fluor 488 標識二次抗体を用いて、可視化した。同時に Alexa Fluor 546 ファロイジンによるアクチンの染色も行った。BoNT および L-TC (50 nM) を播種した細胞では鮮明に蛍光が認められ、また、蛍光染色強度は

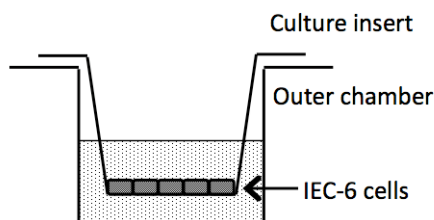


Fig. 1. トランスウェルを用いた細胞培養の模式図。

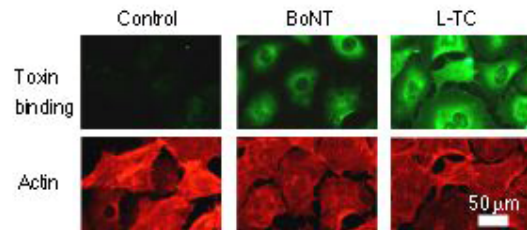


Fig. 2. IEC-6 に結合した BoNT および L-TC の蛍光顕微鏡写真 (×320)。

BoNT より L-TC の方が明らかに高い傾向にあった (Fig. 2)。

Western blot により細胞に対する毒素の結合量を定量的に観察したところ、L-TC は BoNT に比べ、バンド強度がおおよそ 5 倍高く、L-TC は BoNT より細胞に多く結合することが明らかとなった。

(2) 毒素の結合に関与する糖鎖

IEC-6 に対する L-TC の結合における糖鎖の役割を調べるために、L-TC (最終濃度 20 nM) に、1 mM、10 mM あるいは 100 mM の Galactose (Gal)、Lactose (Lac)、*N*-Acetyl galactosamine (GalNAc) およびシアル酸である *N*-Acetyl neuraminic acid (Neu5Ac) を添加して結合実験を行った。Neu5Ac は濃度依存的に L-TC の結合を阻害したことから、細胞表面のシアル酸が L-TC の細胞への結合に関与していることが示唆された。他の糖では結合の阻害は殆ど見られなかった。この結果は、L-TC の IEC-6 への結合には共にシアル酸が必須であることを示唆している。

L-TC の結合にシアル酸が関与していることが示唆されたため、シアル酸を切断するノイラミニダーゼを用いて、さらに詳しくシアル酸の関与を調べた。ノイラミニダーゼが 16.7 mU/mL となるように調製した培養液を用いて、細胞を 37℃ において 1 時間、2 時間および 18 時間インキュベートした。その後、L-TC (最終濃度 20 nM) の結合実験を行った。L-TC の細胞への結合は、ノイラミニダーゼ処理時間に比例して抑制された。以上の結果から、L-TC の細胞への結合はシアル酸を介していることが強く示唆された。

(3) 透過性のある IEC-6 細胞層の作製

本実験では、多孔膜の孔径が 0.4 μm の膜のトランスウェルを使用して透過性のある一層の細胞層を作製した。細胞がトランスウェルの半透膜上で密な結合を形成する条件を調べるためにトランスウェルに播種した細胞層の電気抵抗値 (TER) を Millipore-ERS により測定した。37℃ における TER を培養開始から 1 日毎に 7 日間測定し、透過性を検討した。培養開始から徐々に TER が上昇し、

培養 4 日目には TER が $35 (\Omega \times \text{cm}^2)$ で最大となり、その後、TER はほぼ一定となった。そこで以降の毒素透過実験では、細胞播種後 5 日目のトランスウェルを使用した。

BoNT および L-TC が細胞を能動的な輸送により透過するかどうか確かめるために、37□あるいは 4□で毒素の透過試験を行った。毒素は 100 nM になるように調製し、37 □あるいは 4□で、6 時間インキュベーションした。その後、下室の培養液を採取し、BoNT あるいは L-TC の透過量を測定した。37□では BoNT、L-TC ともに透過が見られたが、4□ではいずれの毒素も透過量は 37□のときの 10%以下であった。このことは、BoNT および L-TC がいずれも細胞を能動的な輸送により透過したことを示唆している。

(4) 毒素の IEC-6 に対する透過性

IEC-6 に対する BoNT および L-TC の透過性を比較するために、20 nM となるように BoNT あるいは L-TC を調製し、トランスウェルの上室に各毒素を入れ、37 □ で 1 時間、6 時間あるいは 24 時間インキュベーションした。下室より培養液を回収し、BoNT あるいは L-TC を Western blot により検出した。BoNT および L-TC はいずれも細胞を透過し、その量は経時的に増加した。また、BoNT よりも L-TC のほうが透過量は 5 倍多かった (Fig. 3)。

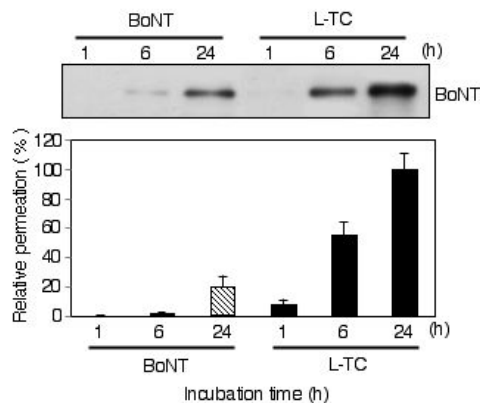


Fig. 3. IEC-6 細胞層を透過した BoNT および L-TC のウエスタンブロット。n = 3、平均値 \pm SE。

(5) 毒素の透過に関与する糖鎖

IEC-6 に対する L-TC の透過における糖鎖の役割を検討するために、L-TC (最終濃度 20 nM) に、1 mM、10 mM あるいは 100 mM の Gal、Lac、GalNAc あるいは Neu5Ac を混合した培養液を用いて毒素の透過実験を行った。結合試験と同様、Neu5Ac は濃度依存的に L-TC の透過を阻害したが、Gal、Lac、GalNAc はほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 4)。このことから、細胞表面のシアル酸は L-TC

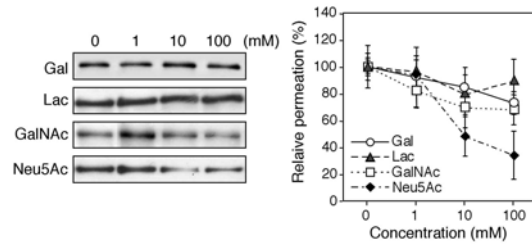


Fig. 4. BoNT および L-TC の透過に対する糖添加の影響。n = 3、平均値 \pm SE。

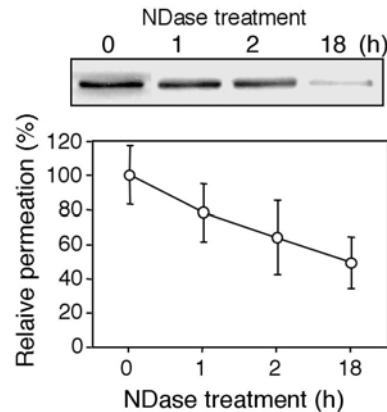


Fig. 5. BoNT および L-TC の透過に対する細胞のノイラミニダーゼ (NDase) 処理の影響。n = 3、平均値 \pm SE。

の細胞への透過に関与していることが示唆された。

L-TC の透過におけるシアル酸の役割をさらに調べるため、ノイラミニダーゼ処理した細胞を用いて毒素の透過実験を行った。培養液中のノイラミニダーゼを 16.7 $\mu\text{M}/\text{mL}$ となるように調製した培養液を用いて、細胞を 37□で 1 時間、2 時間あるいは 18 時間インキュベートし、その後、L-TC (最終濃度 20 nM) の透過実験を行った。結合試験と同様に、細胞をノイラミニダーゼで処理した時間に比例して、BoNT および L-TC の透過が抑制された (Fig. 5)。このことから、細胞表面のシアル酸は L-TC の細胞に対する透過に関与していることが強く示唆された。

(6) IEC-6 に対する HA-33/HA-17 複合体の結合および透過性

L-TC の構成成分である HA-33 が小腸上皮細胞との相互作用に重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで、単離した HA-33/HA-17 複合体の IEC-6 に対する結合および透過試験を実施した。結合試験には 20 nM、透過試験には 40 nM の HA-33/HA-17 複合体を用いた。HA-33/HA-17 複合体の IEC-6 に対する結合および透過におけるノイラミニダーゼ処理の影響を調べた結果、L-TC の

結合および透過試験で得られた結果と同様に、HA-33/HA-17 複合体の結合および透過はノイラミニダーゼ処理による時間経過に依存して抑制された。このことから、HA-33 もしくは HA-17 のシアル酸への結合が L-TC の IEC-6 に対する結合ならびに透過に寄与していることが示唆された。

現在提唱されている L-TC の立体モデルでは、HA-17 は HA-33 と内側にある HA-70 の中間に位置しており、HA-33 が TC の最も外側に位置していると考えられている。このことから、L-TC の細胞への結合および透過は、HA-33 のシアル酸への結合が重要な役割を果たしていることが考えられた。

(7) L-TC の細胞-細胞間結合に対する効果

A、B および C 型の L-TC には、小腸上皮細胞同士の結合を破壊する機能があることが報告されている。そこで、D 型の L-TC も同様の機能を有するか調べた。毒素を添加する前に、細胞を播種したトランスウェルの TER を測定した。その後、100 nM BoNT あるいは 100 nM L-TC をトランスウェルの上室に添加して 6 時間インキュベーションし、再度 TER を測定した。コントロールとして毒素を添加していないトランスウェルを用いた。BoNT を添加したときには TER に変化は見られなかったが、L-TC を添加したときは TER がおよそ半分に減少した。このことは、D 型 L-TC に細胞間の結合を破壊し、細胞間隙を経る物質透過を促進する機能があることを示唆している。L-TC が BoNT よりも細胞をより多く透過するのは、細胞への結合量が多いことのほか、細胞間の間隙が広がることで拡散による透過が増加することが一因となっている可能性がある。

(8) まとめ

本研究により、D 型ボツリヌス毒素の小腸からの吸収機序について以下のことが明らかとなった。1) L-TC は小腸上皮細胞のシアル酸に結合して透過する。2) L-TC はその構成成分である HA-33 を介して小腸上皮細胞に結合し、BoNT よりも効率的に細胞を透過する。

今回得られた知見から、ボツリヌス毒素複合体である L-TC はシアル酸によく結合すること、遊離シアル酸に結合したボツリヌス毒素は腸管から吸収されにくいことが示唆された。ウシの給餌成分にシアル酸様の糖を添加することで、ボツリヌス毒素の経口感染を抑制できる可能性が考えられ、本研究結果はウシボツリヌス症の発症・蔓延の予防法の実用化に寄与する極めて重要な知見である。

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 1 件)

- (1) Yoneyama, T., Miyata, K., Chikai, T., Mikami, A., Suzuki, T., Hasegawa, K., Ikeda, T., Watanabe, T., Ohyama, T. and Niwa, K.

Clostridium botulinum Serotype D neurotoxin and toxin complex bind to bovine aortic endothelial cells via sialic acid. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (査読有) 54:290-298 (2008)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 宮田恵多.
ボツリヌス神経毒素および毒素複合体の小腸上皮細胞への結合および透過機構の解析. 2009年3月14日. 第82回日本細菌学会総会、名古屋.
- (2) 丹羽光一.
D型ボツリヌス毒素の小腸上皮細胞への結合と透過におけるシアル酸の役割. 2008年9月25日. 第146回日本獣医学会学術集会、宮崎.
- (3) 丹羽光一
ボツリヌス毒素複合体を構成する HA 成分の小腸上皮細胞透過機構の検討. 第24回日本 DDS 学会. 2008年6月29日、東京.
- (4) 丹羽光一.
ボツリヌス C 型および D 型毒素複合体の血管内皮細胞への結合機序. 第81回日本細菌学会総会. 平成20年3月24日、京都.
- (5) Keita Miyata.
Mechanism of *Clostridium botulinum* type D toxin complex in binding to bovine aortic endothelial cells. 第30回日本分子生物学会 第80回日本生化学会合同大会. 平成19年12月14日、東京.
- (6) Tohru Yoneyama.
Clostridium botulinum serotype D toxin complex binds to bovine artery endothelial cells via sialic acid moiety. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. 平成19年12月3日、東京.

[その他]

ホームページ:

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3)連携研究者

大山 徹 (OHYAMA TOHRU)

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：60318178

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

小栗 秀 (OGURI SUGURU)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号：70277250