

平成 22 年 5 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790336
研究課題名 (和文) 腸管上皮バリアを破壊するボツリヌス HA の基質分子の探索及び作用機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of intestinal barrier disruption by HA proteins of botulinum toxin

研究代表者

松村 拓大 (MATSUMURA TAKUHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：00456930

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、ボツリヌス神経毒素複合体中の無毒成分の一つである Hemagglutinin (HA) の持つ腸管上皮細胞間バリア破壊作用について解析した。HA のバリア破壊作用を引き起こす基質分子の探索において、Recombinant HA を用いた解析により、ヒト腸管上皮細胞から HA と特異的に結合する標的分子が得られた。次に HA の作用メカニズムを解析する目的で、生体内における動態を解析した結果、HA は特異的な細胞から取り込まれ、その細胞からバリア破壊を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we analyzed the mechanism of disruption of epithelial paracellular barrier function caused by botulinum HA. Using recombinant HA, we purified HA-binding proteins from human intestinal epithelial cell lines. Next, we analyzed the localization of botulinum toxins *in vivo*. The HA bound and transcytosed to the basolateral side and disrupted the epithelial barrier at the specific cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：細菌、ボツリヌス菌、ボツリヌス毒素、腸管上皮細胞間バリア

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス神経毒素（150 kDa）は、エンドペプチダーゼ活性を持つタンパク質毒素である。本毒素は神経細胞においてシナプス小胞の fusion に必要な分子群（SNAREs）を切断し、神経伝達物質の放出を抑制する。本毒素を経口摂取して起こるボツリヌス食中毒の発症には、神経毒素が腸管から吸収され、血中に移行することが必要である。しかし、中毒発症に必須な、最初の関門である腸管上皮バリアの通過機構については不明であった。一方で、本毒素は常に無毒成分との複合体（12S 毒素および 16S 毒素）として *Clostridium botulinum* により産生される。12S 毒素は神経毒素と赤血球凝集活性を持たない無毒成分である NTNH との複合体であり、16S 毒素は 12S 毒素に赤血球凝集活性を持つ無毒成分である HA が結合している（図 1）。

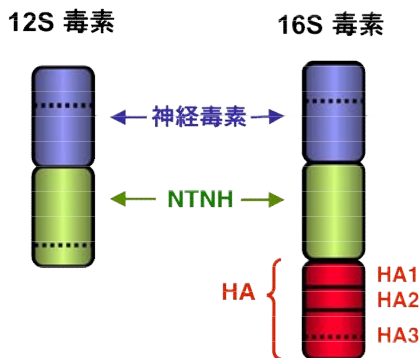


図 1 ボツリヌス神経毒素複合体

これまでに申請者は腸管上皮バリア機能を *in vitro* の系で再現した Caco-2 細胞の transwell 培養系を構築し、この系を用いて無毒成分を含む毒素複合体と腸管上皮細胞バリアとの相互作用について解析を行った。その結果、HA に腸管上皮細胞間バリアを破壊する強力な作用があることを発見し、そ

してこの作用が *in vivo* においても神経毒素を含む巨大分子の吸収を促進することを明らかにした。本研究では、HA の基質分子の探索・同定および作用メカニズムについて検討する。

2. 研究の目的

申請者はボツリヌス神経毒素複合体に含まれる無毒成分中の HA に細胞障害性を示さず腸管上皮細胞間バリアを可逆的に破壊する新規の作用があることを発見し、この作用により神経毒素複合体の吸収が促進されることを明らかにしている。腸管管腔 (apical) 側に存在する HA は、apical 膜上に存在する基質分子に結合し、細胞内を輸送 (transcytosis) され、基底膜 (basolateral) 上へ移行後、basolateral 膜上に存在する別の基質分子に作用することにより細胞間バリアを破壊すると考えられる（図 2）。本研究では、apical 膜上および basolateral 膜上の基質分子の探索・同定、そして *in vitro* および *in vivo* での本毒素複合体の輸送機構の解明の 2 点から、本毒素複合体が腸管上皮バリアを透過する機構を明らかにすることを目的とする。

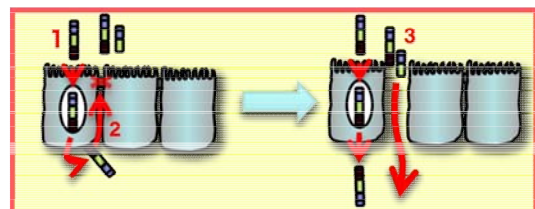


図 2 16S 毒素の腸管上皮細胞バリア通過機構

1. apical 側からの細胞内 transcytosis
2. basolateral 側からの細胞間バリア破壊
3. 細胞間からの毒素複合体の流入

3. 研究の方法

(1) recombinant HA の発現・精製およびバリア破壊活性の確認

標的分子の探索を行うためには多量の HA が必要である。HA は HA1、HA2 および HA3 の 3 つの異なるサブコンポーネントから構成されている。それぞれのサブコンポーネントを recombinant タンパク質として大腸菌に発現させ調整し、バリア破壊活性を測定する。

(2) 標的分子の探索

transwell 細胞培養系を用いて recombinant HA を添加し、基質分子を recombinant HA のタグを用いた pull down 法により探索する。その際、細胞の種類 (Caco-2、MDCK 細胞など)・培養条件 (日数・密度など)・recombinant HA の添加時間・細胞の可溶化に用いる界面活性剤などの条件検討を行い、recombinant HA と共沈する標的分子が最も効率良く得られる条件を決定する。

recombinant HA を beads に固定化した recombinant HA アフィニティーカラムを用いた方法により、recombinant HA に結合する標的分子を単離する。この際、細胞を可溶化する界面活性剤の条件検討を行い、必要に応じて細胞を分画する。

(3) *in vitro* および *in vivo* における神経毒素複合体の腸管粘膜上皮通過機構の解析

神経毒素、神経毒素複合体および無毒成分を蛍光ラベルし、バリア破壊活性が保持されていることを確認する。transwell 培養系を用いて、蛍光ラベルされた神経毒素複合体もしくは無毒成分を細胞 apical 側もしくは basolateral 側へ添加し、それぞれの traffic 経路を confocal 顕微鏡により観察する。

② マウス結紮腸管に蛍光ラベルした神経毒

素もしくは神経毒素複合体を投与し、細胞特異的なマーカーと共に蛍光免疫染色し、コンフォーカル顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

(1) 細胞間バリア破壊を引き起こす HA の標的分子の探索及び同定

HA の各サブコンポーネント HA1、2、3 を recombinant タンパク質として発現し、再構成することにより、native HA と同等の細胞間バリア破壊活性を再現することに成功した。この recombinant HA をヒト腸管上皮細胞 (Caco-2 細胞) に添加し、recombinant HA のタグを用いた pull down 法により、HA と特異的に結合する標的分子の探索を行った。その結果、HA と共沈する標的分子候補が得られた。現在、Western blot、質量分析などにより分子の同定を試みている。

(2) *in vitro* および *in vivo* における神経毒素複合体の腸管粘膜上皮通過機構の解析

Caco-2 cell へ神経毒素もしくは 12S 毒素を添加した場合、細胞への結合、取り込みは非常に弱かった。それに対し、HA を持つ 16S 毒素および HA + NTN1 は apical 側へ添加した場合、細胞表面に強く結合した後、特徴的な小胞として細胞内に取り込まれていた。またオルガネラマーカーである EEA-1 と共局在することから、early endosome へと輸送されていることが明らかとなった (図 3)。さらに 16S 毒素および HA + NTN1 は細胞 basolateral 側へ添加した場合、基底膜に結合した後、細胞間に集積することが明らかとなった。HA がバリア破壊のための基質分子と結合していることが示唆される (図 4)。

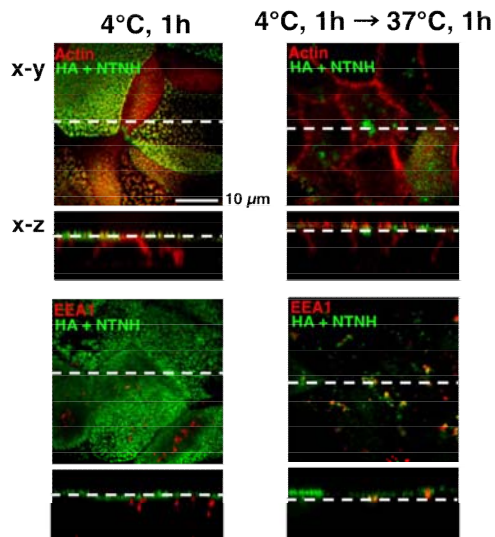


図 3 Caco-2 cell における HA + NTNH の Traffic 機構 (apical addition)

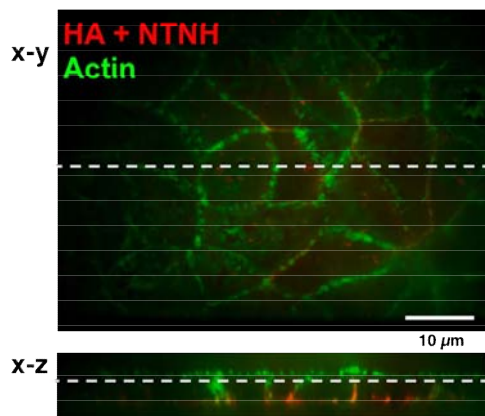


図 4 Caco-2 cell における HA + NTNH の Traffic 機構 (basolateral addition)

次に、実際の生体内におけるボツリヌス毒素の吸収メカニズムを明らかにするために、マウス結紮腸管を用い、神経毒素、12S 毒素、16S 毒素の局在を蛍光免疫染色により解析した。神経毒素および 12S 毒素は腸管上皮への結合は非常に弱い、16S 毒素は腸管上皮に広く結合していた。さらに 16S 毒素は結合した後、小胞として取り込まれ、多くが細胞 apical 直下に存在しているのに対し、ある特定の細胞からは積極的に取り込まれ、

basolateral 側へ移行 (transcytosis) している様子が観察された。またその細胞周辺から paracellular marker の流入が確認でき、HA による細胞間バリア破壊がこの細胞から起こっていることが示唆された。腸管粘膜上皮は多様な細胞により構成されていることが知られているが、この細胞が 16S 毒素の侵入門戸であることが考えられる。現在、細胞特異的なマーカーを用いた共染色などにより、その細胞の同定を行っている。

本研究で得られた結果は、ボツリヌス食中毒の病態発現機構の解明および新規治療法の開発に貢献できるだけでなく、腸管上皮細胞のバリア形成・調節機構および生理的な小胞輸送に関する新たな知見に繋がるものと考えられる。

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 3 件)

Sugawara Y, Matsumura T, Takegahara Y, Jin Y, Tsukasaki Y, Takeichi M, Fujinaga Y
Botulinum HA disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin
J Cell Biol. 査読あり 189巻 2010 691 - 700

Jin Y, Takegahara Y, Sugawara Y, Matsumura T, Fujinaga Y
Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins - differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C
Microbiology 査読あり 155巻 2009 35- 45

Fujinaga Y, Matsumura T, Jin Y,
Takegahara Y, Sugawara Y
A novel function of botulinum toxin-
associated proteins : HA proteins
disrupt intestinal epithelial barrier
to increase toxin absorption.
Toxicon 査読あり 54 巻 2009 583 -
586

〔学会発表〕(計2件)

第82回日本細菌学会総会

Matsumura T, Jin Y, Takegahara Y,
Sugawara Y, Fujinaga Y
The botulinum toxin crosses the
intestinal epithelial barrier via M
cell

平成21年3月12日～3月14日 名古屋
国際会議場

FORUM OF THE NETWORK OF RESEARCH
CENTERS ON INFECTIOUS DISEASES
Matsumura T, Jin Y, Takegahara Y,
Sugawara Y, Fujinaga Y
Analysis of intestinal absorption of
botulinum toxin
平成20年10月6日 National Institute of
Hygiene and Epidemiology(NIHE),Hanoi-
Vietnam

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 拓大 (MATSUMURA TAKUHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：00456930

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし