

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16240

研究課題名（和文）ボツリヌス毒素複合体が腸管バリアを破壊するための細胞外輸送経路の解明

研究課題名（英文）Analysis of transport mechanism of hemagglutinin of botulinum toxin complex to adherens junctions

研究代表者

阿松 翔（Amatsu, Sho）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90827346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ボツリヌス毒素複合体のヘマグルチニン（HA）が上皮細胞のアドヘレンスジャンクション（AJ）に局在するE-cadherinにアクセスするための細胞外輸送経路を解析した。HAは細胞の底部表面に結合した後、側部表面のAJへ移行することを明らかにした。HAのE-cadherin阻害活性はRhoA阻害剤、ROCK阻害剤およびミオシンII阻害剤によって抑制されたことから、HAの細胞外輸送はアクチンフローに依存することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボツリヌス毒素複合体のヘマグルチニン（HA）はE-cadherinに結合して腸管上皮細胞間バリアを破壊することで毒素の経口毒性を顕著に増大させる。本研究では、HAが腸管バリアを破壊するためにアドヘレンスジャンクションへ移動する細胞外輸送経路を解析した。その結果、*in vitro*においてアクチンフロー阻害剤はHAのバリア破壊活性を阻害することを明らかにした。今後、マウスを用いた試験により上記の阻害剤がボツリヌス毒素の経口毒性を低下させるのかを解析する予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have investigated that the extracellular trafficking pathway of hemagglutinin (HA) of botulinum toxin complex to reach adherens junctions (AJs). We demonstrated that HA binds to the basal cell surface and then moves to AJs where E-cadherin resides and forms cell-cell adhesion. In addition, we have revealed that RhoA inhibitor and myosin II inhibitor, which block actin-flow, inhibit the barrier disrupting activity of HA. These results suggest that HA is transported to AJs by actin-flow at the basal and lateral cell surfaces.

研究分野：細菌毒素

キーワード：ボツリヌス毒素 ヘマグルチニン 腸上皮細胞 E-cadherin カドヘリンフロー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス毒素複合体は神経毒素 (BoNT)、non-toxic non-HA (NTNHA) および hemagglutinin (HA) から構成される。我々はこれまでに、HA が E-cadherin に結合することで細胞間接着を阻害し腸管上皮細胞間バリアを破壊することを見出した (Matsumura, et al. Cell Microbiol 2008; Sugawara, et al. J Cell Biol 2010)。HA はバリア破壊により毒素の腸管吸収を顕著に増大させる。E-cadherin が細胞間接着を形成するアドヘレンスジャンクション(AJ) はタイトジャンクション (TJ) の直下に位置しており、HA は頂端部側から E-cadherin に結合することができないが、側底部側に添加した HA は AJ の E-cadherin に結合し腸管バリアを破壊する (Matsumura, et al. 2008)。一方で我々は、HA は AJ にアクセスするためには細胞の底部細胞表面に結合した後、側部細胞表面へ細胞外輸送される必要があることを見出した (Amatsu, et al. Microbiol Immunol 2018)。

2. 研究の目的

本研究では、ボツリヌス HA が AJ にアクセスするために必要な細胞外輸送経路を同定し、腸管バリア破壊の分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(i) 変異体解析

HA は糖鎖および E-cadherin に結合することが知られている。それぞれの結合活性が細胞外輸送に及ぼす影響を解析するために、各結合を欠損する変異体を作成し細胞外輸送を pulse-chase 法で解析した。

(ii) コンフォーカル顕微鏡を用いた HA の動態観察

Transwell に単層培養した Caco-2 細胞または MDCK 細胞の側底部側に HA を添加し、蛍光免疫染色法により側部細胞表面における E-cadherin と HA の局在を解析した。

Caco-2 細胞および MDCK 細胞に EGFP を融合した E-cadherin (E-cadherin-EGFP) を発現するプラスミドをトランスフェクションし安定発現株を樹立した。細胞の側底部側に Alexa568 で蛍光標識した HA (HA-Alexa) を添加し、顕微鏡用培養システムを用いたライブイメージングにより HA-Alexa と E-cadherin-EGFP の動態を観察した。

(iii) 阻害剤を用いた細胞外輸送経路の同定

HA のバリア破壊活性を、Caco-2 細胞を用いた経上皮電気抵抗値 (TER) 測定で評価した。各種阻害剤の存在下でバリア破壊活性を測定した。

4. 研究成果

(i) HA は E-cadherin 結合活性により AJ へ移行する

HA の糖鎖に結合しない変異体は底部から側部へ移行したが、E-cadherin に結合しない変異体は底部に結合するが側部へ移行しなかった。この結果から、HA は E-cadherin に結合して AJ へ移行することが示唆された。新生された E-cadherin は底部または側部細胞表面の下部へ輸送された後、細胞表面上をアクチンフローで移動し (カドヘリンフロー) AJ に集積することが知られている (Kametani & Takeichi. Nat Cell Biol 2007)。以上の結果から我々は、HA は底部細胞表面に輸送された E-cadherin に結合し共に AJ へ移行しているのではないかと仮説を立てた。

(ii) HA の底部から側部細胞表面への移行観察

上記の仮説を検証するために蛍光免疫染色法により HA と E-cadherin の局在を解析した。HA と E-cadherin は、底部側から頂端部側までの側部細胞表面で共局在した (図 1)。この結果より、HA は AJ へ移動する途中の E-cadherin に結合することが示された。HA と E-cadherin が底部から側部細胞表面に共に移動することを直接観察するためにライブイメージングを試みたが、まだ E-cadherin-EGFP 発現細胞でカドヘリンフローが観察できていない。現在、発現細胞の検討および蛍光タンパク質の変更などにより直接観察の実験系の構築を試みている。

(iii) アクチンフロー (カドヘリンフロー) の阻害は HA のバリア破壊活性を抑制する

アクチンフローは Y-27632 (ROCK 阻害剤)、ML-7 (MLCK 阻害剤) および Blebbistatin (Myosin II 阻害剤) により阻害されることが知られている (図 2)。各阻害剤の存在下で HA のバリア破壊活性を測定した結果、Y-27632 および Blebbistatin は有意に活性を抑制した (図 2)。以上の結果から、HA はアクチンフロー (カドヘリンフロー) を利用して AJ へ細胞外輸送されることが示唆された。上記の阻害剤は輸送機能 (アクチンフロー) だけでなく AJ における HA の E-cadherin 機能阻害活性にも影響する可能性がある。今後、阻害剤存在下における HA の局在の変化を解析

することにより詳細な分子機構を明らかにしていく予定である。

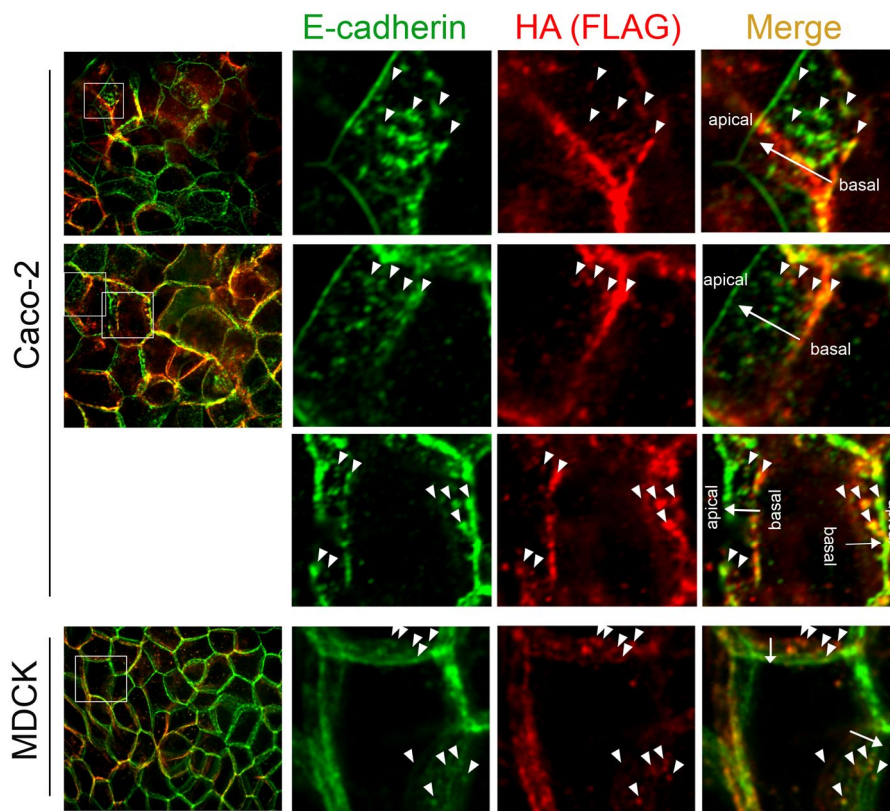


図 1. Caco-2 細胞と MDCK 細胞を用いた HA の動態解析

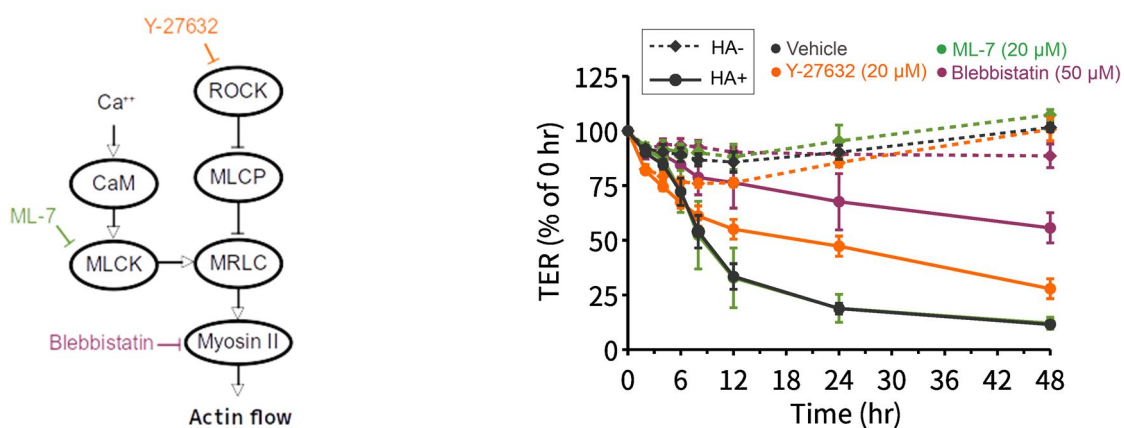


図 2. アクチンフロー阻害剤存在下における HA のバリア破壊活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Sho Amasu, Takuhiro Matsumura, Masahiko Zuka, Yukako Fujinaga. | 4. 巻 299 |
| 2. 論文標題 Molecular engineering of a minimal E-cadherin inhibitor protein derived from Clostridium botulinum hemagglutinin. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 102944 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.102944 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Kobayashi Nobuhide, Abe Kimihiro, Akagi Sachiyo, Kitamura Mayu, Shiraishi Yoshitake, Yamaguchi Aki, Yutani Masahiro, Amatsu Sho, Matsumura Takuhiro, Nomura Nobuhiko, Ozaki Noriyuki, Obana Nozomu, Fujinaga Yukako | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Membrane Vesicles Derived From Clostridium botulinum and Related Clostridial Species Induce Innate Immune Responses via MyD88/TRIF Signaling in vitro | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology | 6. 最初と最後の頁 720308 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.720308 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 阿松 翔 | 4. 巻 130 |
| 2. 論文標題 乳児ボツリヌス症と乳幼児突然死症候群 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 金沢大学十全医学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 14-18 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Matsumura Takuhiro, Amatsu Sho, Misaki Ryo, Yutani Masahiro, Du Anariwa, Kohda Tomoko, Fujiyama Kazuhito, Ikuta Kazuyoshi, Fujinaga Yukako | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Fully Human Monoclonal Antibodies Effectively Neutralizing Botulinum Neurotoxin Serotype B | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Toxins | 6. 最初と最後の頁 302-302 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins12050302 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Amatsu Sho, Fujinaga Yukako | 4. 巻 2132 |
| 2. 論文標題 Botulinum Hemagglutinin: Critical Protein for Adhesion and Absorption of Neurotoxin Complex in Host Intestine | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Methods Mol Biol | 6. 最初と最後の頁 183-190 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0430-4_19 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 阿松翔, 斎藤和樹, 成谷宏文, 藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 ボツリヌス菌の遺伝子改変方法の開発 |
| 3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松村拓大, 阿松翔, 小林英伸, 藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 Endogenous production and neurotoxicity of novel botulinum neurotoxin (BoNT/X) in a clinical isolate |
| 3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口アキ, 松村拓大, 小林伸英, 阿松翔, 藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 A型ボツリヌス神経毒素に対するヒト型モノクローナル抗体の開発・解析 |
| 3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sho Amatsu, Kazuki Saito, Hirofumi Nariya, Yukako Fujinaga |
| 2. 発表標題 Development of Genetic Manipulation methods for Group I Clostridium botulinum |
| 3. 学会等名 59th Intergency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) meeting 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 阿松翔, 塚正彦 |
| 2. 発表標題 腸管ボツリヌス症モデルマウスからのボツリヌス菌検出方法の検討 |
| 3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 森本ちよの, 北村真悠, 藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 ボツリヌス毒素複合体と腸管ムチンとの相互作用解析 |
| 3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 塚正彦, 阿松翔, 栄田貴弘, 萩原早織, 三浦琴美, 美邊暁 |
| 2. 発表標題 真性多血症による脾破裂の一部検例 |
| 3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 阿松翔, 塚正彦 |
| 2. 発表標題 糞便サンプルからのボツリヌス菌の検出方法の検討 |
| 3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿松翔, 松村拓大, 森本ちよの, 北村真悠, 藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 強毒型ボツリヌス毒素複合体の腸管吸収機構 |
| 3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 組み換えボツリヌス毒素複合体の作製と腸管吸収におけるHAの機能解析 |
| 2. 発表標題 森本ちよの, 阿松翔, 北村真悠, 松村拓大, 藤永由佳子 |
| 3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 ボツリヌス毒素複合体の無毒成分HAによる細胞増殖機構の解析 |
| 2. 発表標題 阿松翔, 藤永由佳子 |
| 3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Minimal E-cadherin inhibitor protein derived from hemagglutinin, a non-toxic component of botulinum toxin complex |
| 2. 発表標題 Sho Amatsu, Yukako Fujinaga |
| 3. 学会等名 TOXINS 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 ボツリヌス毒素複合体の無毒成分による細胞増殖機構の解析 |
| 2. 発表標題 阿松翔, 塚正彦 |
| 3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|