

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580432

研究課題名(和文) ボツリヌス毒素の吸収に寄与する小腸上皮細胞の新規シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Signal transduction of intestinal epithelial cells involved in absorption of botulinum toxin.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス毒素複合体(TC)の腸管吸収機序を明らかにするため、TCにより惹起される細胞内シグナルと細胞層の透過性変化を調べた。トランスウェルにラット小腸上皮株化細胞IEC-6を培養して細胞層を形成させ、D型TCを添加すると、細胞層の透過性が増加した。TCはMAPキナーゼであるERKとp38を活性化させた。TCによる細胞層透過性の上昇は、p38阻害剤で抑制されたことから、TCはp38を活性化することで細胞間隙を拡張させると考えられた。TCは細胞内を透過することも確認しており、TCは細胞内のトランスサイトーシスと細胞間隙の透過の両者により腸管を通過して体内に侵入することが分かった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of absorption of Clostridium botulinum toxin complex (TC) from intestine, cellular signaling and changes in paracellular permeability elicited by TC were examined. An addition of TC caused an increase in paracellular permeability of rat intestinal epithelial IEC-6 cells cultured on a porous membrane of Transwell. TC also activated extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38, members of MAP kinases. The permeability increase induced by TC was abrogated by the p38 inhibitor SB203580. These results indicate that L-TC increases paracellular permeability by activating p38. Because it was observed that TC translocates via transcytosis in experiments with confocal microscopy, we conclude that TC translocates intestinal epithelial cell layers via both intracellular and transcellular pathways.

研究分野：細胞生理学、病態生理学

キーワード：ボツリヌス毒素複合体 家畜ボツリヌス症 小腸上皮細胞 エンドサイトーシス 透過性 MAPキナーゼ
腸管吸収

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌は致死性の高い神経毒素を産生し、神経毒素は血清型により A から G 型の 7 種類に分類される。ウシのボツリヌス症は主にサイレージ中に含まれる C、D 型菌が産生した毒素の摂取によって発症し、重篤な神経症状により斃死に至る。ウシのボツリヌス症は、日本を含め、英国、豪州、ブラジルなど世界的に発生が見られる。各国はワクチン接種などの対策を強化しており、毒性発現機序の解明と予防法確立は、本邦でも重要課題である。

ボツリヌス神経毒素は通常は 4 種の無毒タンパク質と結合し、毒素複合体 (TC) として存在する。TC は経口摂取されると小腸から吸収され血液に移行し、神経毒素が神経-筋接合部のアセチルコリン放出を疎害する。神経毒素の構造や機能については国内外で多くの研究があるが、「TC」の小腸からの吸収に関する研究は極めて遅れていた。その原因は、無毒成分の精製が困難で構造や役割が不明であったため、TC はその分子量さえ不明であった。

申請者の研究グループはボツリヌス TC 構成成分の高度な精製に成功し、最近、電子顕微鏡と X 線解析により TC が 14 量体で、3 本のアームを持つユニークな形をしており、分子量 750 kDa であることを初めて明らかにした。申請者は毒素の構造に関する詳細な生化学的情報を背景に、培養細胞を用いて毒素透過試験を行い、1) TC は構成成分である HA-33 を介して小腸上皮細胞の糖鎖に結合すること、2) 糖鎖への結合が毒素の細胞層透過に直接結びつくこと、をこれまでに明らかにしている。

一方、毒素のトランスサイトーシスを制御する細胞内シグナルは全く研究されていない。ヒト感受性の A、B 型ボツリヌス毒素が小腸上皮細胞の細胞間結合タンパクを破壊して細胞間隙を拡張させ、細胞間隙から毒素が侵入するという可能性が示唆されている。申請者は D 型毒素でも同様の現象が起こることを確認している。このようにボツリヌス毒素が小腸上皮を透過する経路にはトランスサイトーシスと細胞間隙透過の 2 つが考えられているが、それらを司る細胞内シグナルは不明である。申請者は、毒素が腸管から吸収される際の小腸上皮の細胞内シグナルを明らかにすることで、家畜ボツリヌス感染症の発症機序解明と予防法開発に寄与することを目的として本研究を計画した。

2. 研究の目的

ボツリヌス TC は小腸上皮の糖鎖に結合することが分かっているが、その後どのような細胞内シグナルが惹起されるのか、トランスサイトーシスと細胞間隙の透過のどちらが毒素の透過に寄与しているのか不明である。申請者は予備実験で、D 型ボツリヌス毒素が小腸上皮細胞の MAP キナーゼを活性化する

こと、A、B 型毒素と同様細胞間隙を拡張させる効果を持つ可能性を見出した。

本研究ではウシボツリヌス症の原因となる D 型ボツリヌス菌由来の TC と、ラット小腸上皮株化細胞 IEC-6 を用い、薬理学・生化学的研究を行い下記の事項を検討してボツリヌス TC の腸管からの吸収機序を解明することを目的とした。

- (1) D 型ボツリヌス毒素のトランスサイトーシスに寄与する細胞内シグナルの同定
- (2) D 型ボツリヌス毒素による細胞間隙拡張の詳細な経時変化
- (3) 細胞間隙拡張作用に寄与する細胞内シグナルの同定
- (4) 小腸上皮の毒素輸送におけるトランスサイトーシスと細胞間隙透過の寄与の割合

3. 研究の方法

(1) ボツリヌス毒素の培養と毒素の精製

ボツリヌス D 型菌 (4947 株) を透析培養し培養上清を陽イオン交換カラム、ゲル濾過に供して 750 kDa 毒素複合体 (L-TC) を単離精製した。L-TC を pH 8.8 のアルカリバッファーで平衡化したゲル濾過カラムに供し、神経毒素と無毒成分 (NTNHA/HA) に分離させた。試料として実験では L-TC、神経毒素、無毒成分を用いた。

(2) 細胞培養

ラット小腸上皮株化細胞 IEC-6 を、ウシ胎仔血清 10% を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いて培養した。培養は 37 °C の CO₂ インキュベーター内で行った。細胞は必要に応じてトランスウェルの半透膜上あるいはディッシュに播種し、コンフルエントな状態で実験を行った。

(3) トランスサイトーシスの可視化

ラット小腸上皮株化細胞 IEC-6 をトランスウェルの半透膜上に播種して単層を形成させ、二重槽培養系を作成した。

L-TC を蛍光色素 Cye5 で標識した。標識した毒素をトランスウェルに添加して 4 °C で 1 時間静置し、細胞に L-TC を結合させた。さらに 37 °C でインキュベーションし、30 分後にホルマリンで細胞を固定した。DAPI で核を、蛍光ファロイジンでアクチンを染色して共焦点顕微鏡で細胞を断層観察し、L-TC が細胞内を輸送されるか調べた。

(4) 毒素の取り込み試験

24 穴培養ディッシュに IEC-6 を播種し、コンフルエントとした。毒素を添加して 15 分 CO₂ インキュベーター内に静置した後、SDS バッファーで細胞を溶解し、SDS-PAGE およびウェスタンブロットに供した。抗体には抗神経毒素抗体を用い、バンド強度を数値化して毒素の細胞への取り込み量の指標とした。

必要なときは毒素の添加 30 分前に阻害剤で細胞を処理した。

(5) 細胞層透過性の測定

トランスウェルに IEC-6 を播種し、コンフルエントとした。毒素をトランスウェルに添

加した後、経時的にホルマリンで細胞を固定した。トランスウェルの上槽と下槽を PBS で満たし、上槽に FITC 標識デキストラン (20 kDa) を最終濃度 10 μ M で加え、60 分間室温で静置した。下槽中の PBS の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定し、透過性の指標とした。

必要なときは毒素の添加 30 分前に阻害剤で細胞を処理した。

(6) MAP キナーゼのリン酸化

10 cm ディッシュに IEC-6 をコンフルエントに播種した。毒素を添加して一定時間のち、細胞を回収して SDS バッファで細胞を溶解し、SDS-PAGE およびウェスタンブロットに供した。リン酸化 MAP キナーゼを特異的に認識する抗体を一次抗体として用い、リン酸化 MAP キナーゼのバンド強度を測定して MAP キナーゼの活性の指標とした。

4. 研究成果

(1) トランスサイトーシスの可視化

ボツリヌス毒素を蛍光色素 Cye5 で標識し、トランスウェルに播種したラット小腸上皮細胞 (IEC-6) に 4 で毒素を添加し結合させた。37 でインキュベーションして 30 分後に共焦点顕微鏡で観察したところ、毒素が細胞内を透過していることが観察された (図 1)。

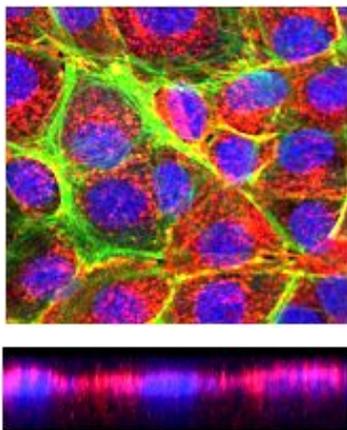


図 1. 細胞内の L-TC (赤)。下図は細胞の横断面。青:核; 緑:アクチン。

(2) 毒素の取り込みの分子機構

細胞への毒素の取り込みに関与する細胞内分子を調べるため、細胞を各種阻害剤で処理した。アクチンフィラメントの関与を調べるために Cytochalasin B、微小管の関与を調べるために Nocodazole、細胞膜に局在しているコレステロールの関与を調べるために M β CD を用いた。またクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤として Chlorpromazine-HCl、カベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤として Filipin complex を用いた。

L-TC の取り込み量は細胞膜局在コレステロールを除去する M β CD およびクラスリン形成を阻害するクロルプロマジンによって抑制された。以上の結果から、D 型 L-TC は細胞のコレステロールに富んだ部位からの

クラスリン依存性エンドサイトーシスによって取り込まれることが示唆された。

(3) L-TC による細胞層透過性上昇

トランスウェルに IEC-6 を播種し、蛍光デキストランの透過量を測定して細胞層の透過性を調べた。L-TC あるいは無毒成分を添加すると、経時的に透過性が上昇したが、BoNT の添加では透過性は変化しなかった (図 2)。

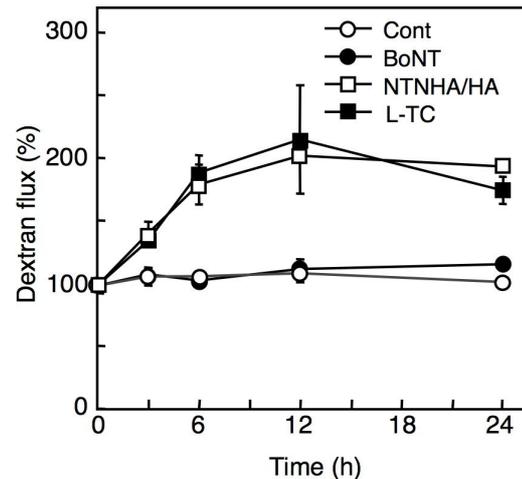


図 2. トランスウェルに播種した IEC-6 の細胞層の透過性の経時変化。BoNT: 神経毒素; NTNHA/HA: 無毒成分。n=3, 平均値 \pm 標準誤差。

(4) 透過性上昇に寄与するシグナル

MAP キナーゼが L-TC による透過性上昇に寄与しているか否かを検討した。ウェスタンブロットにより MAP キナーゼのリン酸化を調べたところ、L-TC あるいは無毒成分は ERK、p38 を活性化したが、JNK は殆ど活性化しなかった。BoNT は MAP キナーゼの活性に影響を与えなかった。

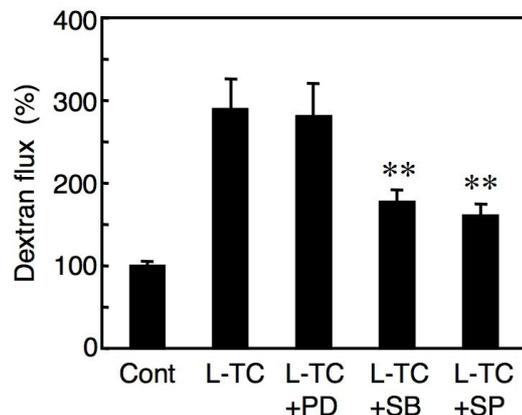


図 3. TC による IEC-6 の透過性上昇に対する阻害剤の効果。PD, PD98059; SB, SB203580; SP, SP600125. n=6-15, 平均値 \pm 標準誤差。** P<0.01.

次に各キナーゼの特異的阻害剤が透過性の上昇に及ぼす影響を検討した。L-TC による IEC-6 の透過性の上昇は、ERK の阻害剤であ

る PD98059 (20 μM)により影響を受けなかった。一方、透過性の上昇は p38 の阻害剤である SB203580 (20 μM)、JNK の阻害剤である SP600125 (20 μM) により抑制された (図 3)。

JNK は L-TC により活性化されていないにもかかわらず、透過性上昇が JNK の阻害剤により抑制された。このことは、JNK が無刺激時においてもある程度活性化して、透過性を上昇させる機能をもつことを示しているのかもしれない。

以上の結果から、L-TC は p38 の活性化を惹起することで小腸上皮細胞の透過性を上昇させることが分かった。

(5) 総括

本研究により、ボツリヌス毒素 TC は小腸上皮細胞の p38 を活性化することで細胞間隙を拡張させること、この効果は神経毒素ではなく無毒成分によるものであることが初めて明らかとなった。また、ボツリヌス毒素 TC が小腸上皮細胞層を通過するときは、細胞内のトランスサイトシスと、拡張した細胞間隙の両者を利用することが示唆されたが、その寄与の度合いを明らかにするには至らなかった。

本研究結果は、家畜ボツリヌス中毒の発症機序に関する新たな知見であり、中毒の予防法の開発に寄与すると考えられる。

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 1 件)

Miyashita S-I., Sagane Y., Inui K., Hayashi S., Miyata K., Suzuki T., Ohyama T., Watanabe T., Niwa K. Botulinum toxin complex increases paracellular permeability in intestinal epithelial cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. 査読有り, Journal of Veterinary Medical Science, 75 巻 1637-1642 (2013)
DOI: 10.1292/jvms.13-0164

[学会発表](計 4 件)

宮下慎一郎、丹羽光一、相根義昌、林慎太郎、渡部俊弘. D 型ボツリヌス毒素複合体による小腸上皮の透過性上昇における MAP キナーゼの関与. 第 81 回日本細菌学会北海道支部学術総会、2014 年 8 月 29 日-30 日、札幌医科大学 (札幌市)

宮下慎一郎、相根義昌、林慎太郎、鈴木智典、丹羽光一、渡部俊弘. D 型ボツリヌス神経毒素結合タンパク質 非毒非血球凝集素のヒト大腸癌細胞への結合および透過. 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26 日-28 日、タワーホール船堀 (東京都)

宮下慎一郎、相根義昌、林慎太郎、鈴木智典、丹羽光一、渡部俊弘. D 型ボツリヌス神経毒素結合タンパク質 NTNHA はラット小腸上皮細胞へ結合し細胞層を透過する. 第 80 回日本細菌学会北海道支部学術総会、2013 年 8 月 30 日-31 日、東京農大生物産業学部 (網走市)

狩野聡史、相根義昌、宮下慎一郎、犬井健、川根武紘、栗原小百合、林慎太郎、渡部俊弘、丹羽光一. D 型ボツリヌス毒素の小腸上皮細胞層透過に關与する細胞内分子機構. 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14 日-16 日、福岡国際会議場 (福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioindustry.nodai.ac.jp/%7Eseika/>

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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

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

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