

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658284

研究課題名(和文)細胞内へのタンパク質トランスポートシステムの試作

研究課題名(英文)The experimental production of the protein transport system to the cytoplasm.

研究代表者

西河 淳(NISHIKAWA, Atsushi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30218127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：経口接種されたボツリヌス毒素複合体は、構成する無毒のタンパク質(HA等)や神経毒素タンパク質(NTX)の巧妙な感染機構により、NTXの一部を神経細胞内に注入して細胞機能を破壊し筋弛緩性麻痺を引き起こす。そこで、この機構を逆に利用すれば、有用タンパク質を目的細胞内に送達する新たなシステム(DDS)の創製につながるとの着想から、本研究では、まず、1、モデル注入体の試作、2、DDSが効率よく動作しているかの測定法の確立、3、より詳細な毒素感染機構の解明に取り組み、1-3それぞれについてDDS創製の基盤となる成果をあげることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Botulinum progenitor toxin consists of one neurotoxin (NTX) and multiple non-toxic components including several haemagglutinin (HA) proteins. Orally ingested NTX passes through the epithelial layer into the blood circulation system with the aid of HA components, and specifically binds to the peripheral nerve cells, and invades into cytoplasm, then causes food-borne botulism. In this study, we challenged the development of novel drug delivery system (DDS) utilizing the botulinum tactical infection mechanism, and a several results which provide a platform for novel DDS were obtained.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：ボツリヌス毒素 ドラッグ・デリバリー・システム

### 1. 研究開始当初の背景

筋弛緩性麻痺を引き起こすボツリヌス神経毒素 (NTX) は、その抗原性の違いから A-G のタイプに分類され、多くのタイプでは食品中や培養液中で複数の無毒タンパク質 (HA1、HA2、HA3、HTNH) と会合した巨大タンパク質複合体として存在している。感染・作用経路には幾つかの説があり未だ詳細は不明なところもあるが概略を述べると、(1) 経口摂取された毒素複合体は無毒成分により消化酵素による分解から逃れて腸に達し、(2) 腸上皮細胞間バリアーを通過して NTX が体内循環系に移行し、(3) NTX が神経細胞表面のレセプターに結合してプロテアーゼ活性のある NTX の一部分が細胞質に侵入し、(4) SNARE タンパク質を切断してアセチルコリンの放出を阻害するとされている。

NTX は、一本のポリペプチドとして生合成された後、特別なプロテアーゼの作用によりニックが入り、図 1 a に示すように分子量 5 万の軽鎖 Lc と分子量 10 万の重鎖 Hc が一つのジスルフィド (S-S) 結合で繋がった構造をしている。各部位の役割は、軽鎖は上記 (4) で作用するプロテアーゼ活性を有し、重鎖は上記 (3) において標的細胞表面のレセプターに結合する C 末端側 Hcc 結合ドメインと、標的細胞にエンドサイトーシスで取り込まれた後エンドソームの膜に孔を形成して軽鎖を細胞質側に送り込む役割を持つ孔形成ドメイン Hcn がある。図 1 b は NTX の結晶構造解析による推定構造、c は模式図ですべて左側が N 末端になるように配置している。結晶構造から、孔形成ドメイン Hcn には 100 Å を超える長い  $\alpha$ -ヘリックスが 2 本、短いものが 3 本あり、この部分が酸性条件下で構造変化を起こし、膜内に孔を形成して活性ドメイン Lc を細胞質に注入すると考えられている。

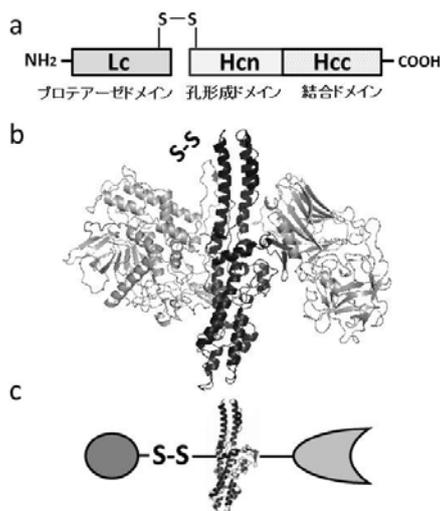


図1 NTXのドメイン構造と模式図

NTX の神経細胞への詳細な感染機構は、図 2 に示すように、まず①標的細胞表面に出ているシナプス小胞タンパク質と GT1 b 等のガングリオシドの両方を認識して結合し、次に

②細胞のエンドサイトーシス機構で細胞内に取り込まれ、③エンドソームに達する。この辺りから小胞内は弱酸性となりその刺激により④Hcn が構造変化を起こし小胞の膜に孔を形成し、この時に Lc を細胞質側に移入する。細胞質では還元性が強いのでジスルフィド結合は還元切断され Lc が細胞質内で遊離状態となる。神経細胞内には神経伝達物質を内包し膜上にシナプトブレベリンを持つシナプス小胞があり、これが興奮時に神経終末内面にある膜タンパク質シンタキシン 1、SNAP-25 と結合・膜融合し神経伝達物質を開口放出する。細胞質内で遊離の Lc はこれら三つの SNARE タンパク質を切断することにより神経伝達を遮断する。

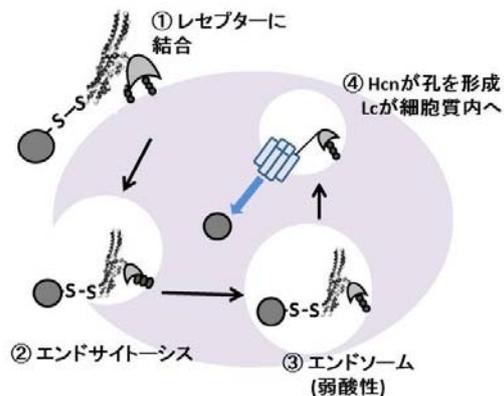


図2 NTXの神経細胞への感染機構

このようにボツリヌス神経毒素はホストの正常な営みをうまく利用し、体内侵入、細胞内毒素移行をはたしているが、もしこれを逆に利用し、様々な有用タンパク質を細胞内に送達する方法に応用できれば、研究に用いる試薬としての利用はもとより、全く新しい機構でのドラッグデリバリーシステム (DDS) の創製に繋がることが考えられる。

### 2. 研究の目的

任意の有用タンパク質を特定の標的細胞の中に送達するシステムの開発を最終目標とし、本研究はボツリヌス毒素の持つ巧妙な体内侵入、感染機構を我々の意図する DDS に応用できるかその可能性を見いだす挑戦的萌芽段階と位置づけ、その基盤となる現象の確認と知見の蓄積を目的とした。具体的には、NTX の Lc 部位に代わってモデルタンパク質 Tobacco Etch Virus プロテアーゼ (TEVP) を効率よく標的細胞質内に注入するシステムの構築を想定し、(1) TEVP が効率よく細胞質内に移行しているかを測定する方法の確立、(2) モデル注入体の試作、(3) より詳細な毒素感染機構の解明の三つの項目について検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 注入効率測定法の確立

まず、有用タンパク質を特定の標的細胞質

内に移行させるシステムの開発研究において、最も重要な細胞質内へのトランスポートがうまく行われたかの評価方法の確立を研究の第一段階と位置づけ、注入された TEVP 量を蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer : FRET) で高感度に測定する方法の確立に取り組んだ。

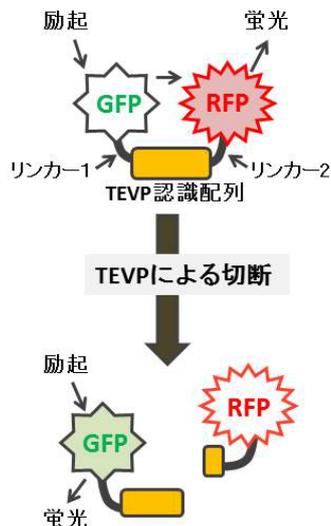


図3 FRETによる測定原理

図3のような測定原理に基づき GFP2 と RFP の cDNA 間に種々の長さのリンカーと TEVP 切断サイトを CMV プロモーターの下流に組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製し、培養細胞に導入、発現させ、共晶点レーザー顕微鏡を用いたアクセプターブリーチング法で FRET 効率を測定しすることにより、FRET 効率のよりよい融合タンパク質発現プラスミドの試作検討を行った。

#### (2) モデル注入体の設計

一本鎖のポリペプチドとして生合成された C 型 NTX は、437 番目の Cys と 453 番目の Cys が S-S 結合を形成しており、菌体外に放出された後、同じく菌が分泌するプロテアーゼ (既に精製・同定されている : Suzuki *et al.* 2009, BBRC) によってそのシスチン間のループ構造にニックが入るため、結果的に S-S 結合で繋がった二本鎖構造となる。細胞質内注

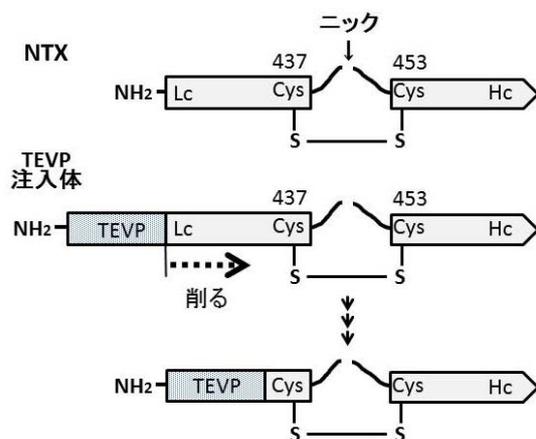


図4 TEVP注入体の分子設計

入タンパク質のモデルとして当初はエンテロキナーゼを選定していたが、大腸菌での発現が難しかったため、TEVP を選定した。TEVP は、特異的なアミノ酸配列を認識して切断するシステインプロテアーゼで分子量は約 27 kDa、細胞質内の pH や弱い還元性の環境下でもよく作用すると考えられる。そこで、TEVP と NTX の融合体を大腸菌発現タンパク質として作製することとし、TEVP の cDNA の後に NTXLc の 5' 側を削った cDNA を繋ぎ、大腸菌で一本鎖のポリペプチドとして発現させ、精製後に前記の特別なプロテアーゼでニックを入れることにより、S-S 結合で繋がった二本鎖 TEVP 注入体を作製する計画とした。その際、NTX の 437-453 間のループを形成するアミノ酸配列の長さや、437Cys より上流のアミノ酸配列を何処まで TEVP の C 末端側に付加すれば計画通りの S-S 結合が形成され、さらに効率よくニックが入るかを検討する必要がある。本研究ではまず、大腸菌で大量に発現させた Hc 部分に本来の神経細胞への結合性と孔形成能が備わっているかを確認することとした。

#### (3) 毒素複合体の構造解析

毒素複合体を構成する無毒成分は、経口接種された毒素が体内循環系に侵入する経路において、消化酵素の作用に耐え小腸に到達して上皮細胞に結合する等とても大きな役割を果たしていることが明らかになっている。しかし、その侵入経路の詳細や、複合体全体の構造、他のタンパク質、糖鎖との相互作用など未解明の部分も残っており、この経路を DDS に利用するためにそれらを明らかにすることは重要である。そこで本研究では、無毒成分の全体構造の解析を計画した。具体的には、HA2 は His タグ融合、HA3 は MBP タグ融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ、菌体を破碎後、粗精製の段階で両者を混合し、一晚静置して複合体を形成させた。複合体は、まず、アミロースカラム、次に Ni-NTA カラムを用いて精製し、FactorXa によって His タグ、MBP タグを切断して、最終的に純度の高い HA2-3 複合体を調整した。得られた HA2-3 複合体を様々な条件下でハンギング・ドロップ蒸気拡散法による結晶化を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) DDS 効率測定法の確立

TEVP が細胞内に移行したことを高感度で検出するための FRET タンパク質の設計において、GGGS 配列を 1 ユニットとし、リンカー 1 とリンカー 2 の部分にそれぞれ異なるユニット数を導入したもの、逆に挿入ユニット配列を減らし GFP2 の C 末端側も削ったもの等の融合タンパク質発現プラスミドを種々作製し、Neuro-2a 細胞に導入して発現させ、アクセプターブリーチング法で FRET 効率を測定した。結果、GFP2 の C 末端側から 11 残基

を削り、挿入ユニット数を0としたコンストラクトのFRET効率が0.10と最も良い値を示した。そして、この融合タンパク質発現細胞を破碎し、得られた上清にTEVPを作用させてnative電気泳動に供し、TEVPによる切断も確認できた。FRET効率0.1は比較的低い値であるため、今後もより良いコンストラクト作製の検討は続けるが、今回得られたコンストラクトを恒常的に発現する細胞をクロニングし、DDS効率測定用の細胞株を樹立することも現在始めている。

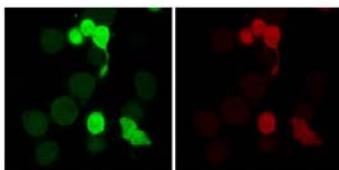


図5 Neuro-2aに融合タンパク質発現ベクターを導入し、FRETを観察した  
左: Ex 488 nm, Em 493-535 nm(GFP2の蛍光)  
右: Ex 488 nm, Em 566-685 nm(FRETによる蛍光)

## (2)モデル注入体の検討

用いる培養細胞をマウス神経芽細胞腫Neuro-2aとし、大腸菌で発現させたNTXのHcドメインが正しい立体構造をとっているか、Neuro-2aに結合することが出来るかを検討した。結果、大腸菌発現HcをpH5の酸性条件下におくと、直ちに構造変化をおこすことがTrpの蛍光スペクトル変化から観察され、Neuro-2a細胞表面に結合することも確認され、正しい立体構造を持つHcタンパク質の大腸菌による大量発現が可能なが判明した。今後は、TEVP-NTX(N末端側から437Cysの手前までを欠失)融合タンパク質を作製し、NTXの437Cys-453Cys間にニックの入ったモデル注入体の作製を試みる。

## (3)毒素複合体の構造

C型HA2-3複合体が正八面体の結晶として得られたため、X線結晶構造解析を試みた(結晶化条件の詳細は下記論文1を参照)。本複合体は分子量が260kDaと大きいためか、X線回折像は8.0Åと分解能の低いものであったが、D型のHA1-2複合体(Hasegawaら*J. Biol. Chem.* 2007)と、C型のHA3の立体構造(Nakamuraら*J. Mol. Biol.* 2009)のデータを利用し、分子置換法を用いてHA1-2-3複合体の立体構造を推定した。

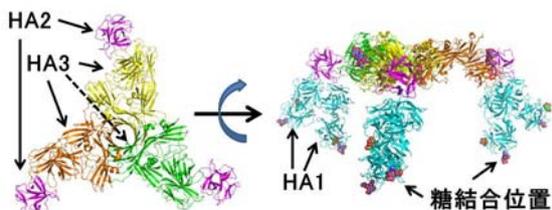


図6 複合体の推定構造

左: HA2-3複合体(HA3が3分子、HA2が3分子からなる)。右: HA1-2-3複合体(左のHA2-3複合体を90度上方に回転させ、HA1を加えた。HA1の先端にある赤い粒は結合する糖を示している)。

この構造解析により、これまで生化学的手法により推定されていた毒素複合体における無毒成分の構成比HA1:HA2:HA3:NTNH=6:3:3:1が裏付けられた。そして、複合体の立体構造が、糖結合部位が一方に偏った3本足のテーブルのような形であることが明らかとなった。

## (4)まとめ

上記のように、ボツリヌス毒素複合体の巧妙な体内侵入、感染の機構を逆に利用し、有用タンパク質を目的細胞質内に送達する新たなDDSの創製において、その基盤となる技術が確立され、多くの知見が得られた。今後は、この「挑戦的萌芽」段階にある本研究を発展させ、細胞内タンパク質導入試薬としての実用可能性の実証、そしてDDS創出へと繋げて行きたい。

## 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)

1, Chikako Iwasa, Takashi Tonozuka, Masaya Shinoda, Yoshimasa Sagane, Koichi Niwa, Toshihiro Watanabe, Hiromi Yoshida, Shigehiro Kamitori, Toshifumi Takao, Keiji Oguma, Atsushi Nishikawa, "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of an HA17-HA70 (HA2 - HA3) complex from Clostridium botulinum type C progenitor Toxin." *Acta Crystallographia*, F70, 64-67. 査読あり, Doi:10.1107/S2053230X13032378

2, Yoshimasa Sagane, Shintaro Hayash, Takashi Matsumoto, Shin-ichiro Miyashita, Ken Inui, Keita Miyata, Shunsuke Yajima, Tomonori Suzuki, Kimiko Hasegawa, Akihito Yamano, Atushi Nishikawa, Tohru Ohyama, Toshihiro Watanabe, Koichi Niwa, "Sugar-induced conformational change found in the HA-33/HA-17 trimer of the botulinum toxin complex." (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 483-487. 査読あり, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.112

[学会発表](計 1件)

1, ○岩佐知可子, 殿塚隆史, 篠田昌也, 中村智美, 中北慎一, 神鳥成弘, 小熊恵二, 西河淳, 「C型ボツリヌス毒素複合体構成成分HA2-3複合体の構造と機能の解析」、日本生化学会、2013年9月11日~13日、パシフィコ横浜

[図書](計 1件)

1, Takashi Tonozuka, Keiji Oguma, Atsushi Nishikawa, "Traffic of botulinum toxin complex", Springer, *Glycoscience*:

Biology and Medicine, Naoyuki Taniguchi,  
Tamao Endo, Gerald Hart, Peter Seeberger,  
Chi-Huey Wong (Eds.), 2014, in press.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西河 淳 (NISHIKAWA, Atsushi)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30218127