

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860319

研究課題名(和文) C型ボツリヌスヘマグルチニンによる細胞障害活性のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of the cytotoxic effect exerted by type C botulinum hemagglutinin

研究代表者

菅原 庸 (Sugawara, Yo)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：70452464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス神経毒素はヘマグルチニン(HA)を含む複数のタンパク質分子からなる複合体として存在し、神経毒素の抗原性などによりA-Gの7つの血清型に大別される。C型HAはある種の上皮細胞の形態変化を引き起こし、細胞増殖を抑制する活性を有するが、その分子機序は不明であった。本研究では、C型HAが細胞膜上のガングリオシドのシアル酸に結合することにより、活性を示すことを明らかにした。また、C型HAはガングリオシドのなかでも、GM3と $\alpha$ 経路のガングリオシドを特異的に認識し、これらのなかでもGM3が活性を発揮するために必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Botulinum neurotoxin is conventionally divided into seven serotypes designated A-G, and is produced as large protein complexes through associations with nontoxic components, such as hemagglutinin (HA). Type C HA (HA/C) is known to affect cell morphology and viability, the mechanism of which remains unknown. In this study, I identified GM3 as the target molecule of HA/C. I found that sialic acid binding of HA is essential for the activity. It was abolished when cells were pretreated with an inhibitor of ganglioside synthesis. Consistent with this, HA/C bound to GM3 and  $\alpha$ -series gangliosides in a glycan array. In parallel, I isolated clones resistant to HA/C activity from a susceptible mouse fibroblast strain. These cells lacked the expression of ST-1, the enzyme that transfers sialic acid to lactosylceramide to yield GM3. In addition, these clones became sensitive to HA/C activity when GM3 was expressed by transfecting the ST-1 gene. Thus, HA/C affects cells in a GM3-dependent manner.

研究分野：細菌学、細胞生物学

キーワード：ボツリヌス毒素 ヘマグルチニン シアル酸 ガングリオシド GM3 糖鎖アレイ アクチン骨格

### 1. 研究開始当初の背景

*Clostridium botulinum* などが産生するボツリヌス神経毒素は、そのメタロエンドペプチダゼ活性により、ヒトや家畜に対して弛緩性の麻痺を特徴とするボツリヌス中毒を引き起こす。本毒素は神経毒素の抗原性に基づき A~G の 7 つの血清型に大別され、それらは基質とするタンパク質や中毒を引き起こす動物種などが異なる。神経毒素は常に、毒性のない無毒成分と会合した複合体として産生される。A~D 型の毒素の場合、無毒成分は赤血球凝集活性のない Non-toxic non-hemagglutinin (NTNHA) と赤血球凝集性を有する Hemagglutinin (HA) から構成される。HA は HA1、HA2、HA3 の 3 種類のタンパク質 (サブコンポーネント) によって構成される分子量約 500 k のタンパク質複合体である。

ボツリヌス神経毒素は、複合体の分子量が大きいほど経口毒性が高いことが知られている。C 型毒素の場合には、神経毒素・NTNHA の複合体 (M-PTC) より神経毒素・NTNHA・HA の複合体 (L-PTC) の方が約 30 倍経口毒性が高いことが報告されている。この結果は、高分子量の複合体ほど胃液や腸液などにおける毒素複合体の安定性が高いとの実験結果と相関することから、HA と NTNHA は神経毒素を安定化させることにより毒素複合体の経口毒性を高めていると考えられている。

しかしながら、本研究代表者らの研究成果によって、L-PTC 中の HA は単に神経毒素の保護に働くだけでなく、宿主の上皮細胞に対してユニークな活性を示すことにより、毒素の経口毒性を高めている可能性が考えられるようになってきた。すなわち、A 型と B 型 HA は、E-cadherin 依存性の細胞間接着を破壊する活性を持つことが明らかとなった。この活性により腸管の上皮バリアを破壊し、毒素の腸管吸収を促進している可能性が考えられる。一方で C 型 L-PTC は、E-cadherin に対する結合性は有さないが、上皮細胞に対して細胞障害活性を示すことが見出された。この活性は HA を持たない M-PTC では見られないことから、C 型 HA がこの活性を有していると考えられた。この C 型 HA による細胞障害活性についても、毒素の経口毒性を高めることに寄与している可能性が考えられるが、その分子メカニズムは全く分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、C 型 HA が結合する哺乳動物細胞の細胞膜上の標的分子を同定し、C 型 HA による細胞障害活性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

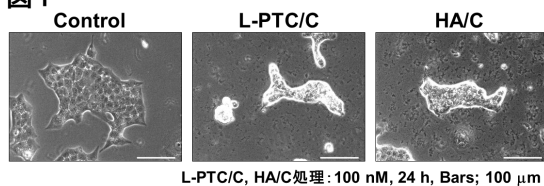
実験に用いた組換え体 HA 複合体は、大腸菌の発現系により調製を行った。HA の 3 つのサブコンポーネントをそれぞれ発現させ精製し、得られたタンパク質を *in vitro* で混

合し 37 でインキュベートすることにより、HA 複合体を得た。イヌ腎上皮 MDCK 細胞に対する細胞障害活性は、生細胞数測定試薬 SF (Nacalai tesque) を用いて細胞増殖への影響を定量化することにより評価した。HA の活性に必須な糖鎖修飾を明らかにする目的で、O 結合型糖鎖修飾阻害剤と glucosylceramide 合成酵素阻害剤 (Sigma Aldrich) を用いた。HA が結合する糖鎖の解析には、糖脂質糖鎖アレイ (住友ベークライト) を用いて検討を行った。マウス繊維芽細胞におけるガングリオシド生成酵素遺伝子の発現確認は、RT-PCR により行った。培養細胞への遺伝子導入は ScreenFect A (Wako Pure Chemical Industries) を用いて行った。細胞内の F-アクチンを可視化するために、Alexa568 ラベルされた phalloidin を用いた。ガングリオシドの発現パターン解析のため、培養細胞からクロロホルム・メタノール・水混合溶液により脂質を抽出したのち、DEAE Sephadex A-25 (GE Healthcare) を用いてガングリオシド画分を調製した。調製したサンプルは薄層クロマトグラフィーに供し、オルシノール硫酸で染色することにより、ガングリオシドを検出した。

### 4. 研究成果

これまでの知見から、C 型 L-PTC の細胞障害活性は L-PTC を構成する HA によるものであることが予想されていたが、その証明はなされていなかった。そこで、大腸菌の発現系を用いて組換え体 C 型 HA の調製を行った。この組換え体 C 型 HA (HA/C) を MDCK 細胞に作用させたと、細胞を凝集させ増殖を抑制するといった C 型 L-PTC (L-PTC/C) と同様の活性を示すことを確認することができた (図 1)。

図 1



C 型 HA は MDCK 細胞の形態を変化させ増殖を抑制する活性を持つ一方で、B 型 HA にはそのような活性は見られない。そこで、B 型と C 型の比較により、活性に必須なサブコンポーネントの同定を試みた。HA のサブコンポーネントのそれぞれを B、C 型間で置換したキメラ複合体を作製し細胞に作用させたと、C 型の HA1 をもつ複合体でのみ増殖抑制活性が観察された。

HA1 は糖鎖結合活性をもつことが以前から知られているが、その結合特異性は血清型間で異なることが報告されている。すなわち、B 型 HA1 はガラクトースに対する結合活性を有するのに対して、C 型 HA1 はガラクトース結合に加えてシアル酸結合部位を有してい

る。したがって、このシアル酸結合活性が C 型 HA の活性を決定づけることが予想された。実際に HA1 にシアル酸結合活性を欠失させるような変異 (W176A) を導入したところ、C 型 HA の細胞増殖抑制活性は解除された。また、C 型 HA を細胞に作用させる際に、培地に遊離のシアル酸を添加することにより、C 型 HA の活性は減弱することが明らかとなった。以上の結果から、C 型 HA は HA1 のシアル酸結合を介して細胞の形態を変化させ、増殖を抑制していると考えられた。

シアル酸は哺乳動物細胞の細胞膜上では、N 結合型糖鎖、O 結合型糖鎖、あるいはガングリオシドの糖鎖の一部として存在している。そこで、それぞれの生合成に対する阻害剤を用いて、C 型 HA がどのような糖鎖に作用しているのかを検討した。その結果、ガングリオシドの前駆体である glucosylceramide の合成酵素阻害剤である PMP で細胞を前処理することにより、C 型 HA の活性は完全に阻害されることが明らかとなった。一方で O 結合型糖鎖修飾阻害剤である Benzyl-GalNAc については部分的な阻害しか見られず、また、N 結合型糖鎖修飾阻害剤として用いた Tunicamycin は細胞毒性が強く検討ができなかった。

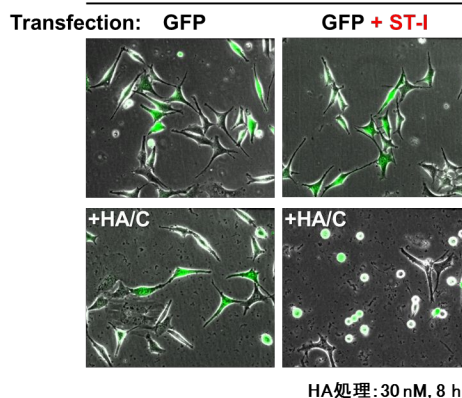
次に C 型 HA が実際にガングリオシドの糖鎖を認識するかどうかを、糖脂質糖鎖アレイにより検討を行った。アレイは、ガングリオシドの糖鎖部分のみがその還元末端を介して固定化されているものを用いた。検討の結果、C 型 HA は GM3 と GM3 を前駆体として合成される a 経路のガングリオシドに結合することが明らかとなった。この結合は W176A 変異体では見られないことから、HA1 のシアル酸認識に依存した結合であることが考えられた。

GM3 などの比較的単純なガングリオシドは、より複雑なガングリオシドの前駆体となることから、その発現は上皮に限らず、動物組織全般に見られる。そこで、MDCK 細胞以外の細胞株について検討を行ったところ、ヒト子宮頸癌由来 HeLa やハムスター卵巣細胞 CHO-K1、マウス繊維芽細胞 L が、程度に差はあるものの C 型 HA に対して感受性を示すことが分かった。これらの中でも L 細胞は比較的感受性が高く、C 型 HA 処理により、細胞は完全に丸くなり、培養皿からはがれる様子が確認できた。

この L 細胞を C 型 HA 存在下で培養することにより、ほとんどの細胞が丸くなり結果として死んでしまうが、一部の細胞が増殖し続けることを見出し、このような細胞を単離することができた。MDCK 細胞を用いた実験結果により、ガングリオシドが C 型 HA の活性に関わることが示唆されていたので、得られた非感受性細胞におけるガングリオシド生合成酵素の発現パターンを RT-PCR により確認し、親株との比較を行った。その結果、L 細胞の親株では、GM3 の生合成酵素である ST-1

(あるいは GM3 synthase) が発現しているのに対して、非感受性細胞ではその発現が消失していることが明らかとなった。また、これら L 細胞では GM3 から GM2 の生合成を担う GalNAc-T と呼ばれる酵素の発現が見られないことから、GM3 でガングリオシドの生合成が止まっていることが予想された。実際に細胞からガングリオシドを調製し、発現パターンを調べたところ、親株ではほぼ GM3 のみが発現しており、非感受性株ではそれが消失していることを確認できた。この非感受性細胞に ST-1 遺伝子を導入し、GM3 を発現させることにより、C 型 HA に対する感受性は復帰することから、GM3 が活性に必須であることが明らかとなった (図 2)。さらに、L 細胞の親株

図2 L細胞 (非感受性株)



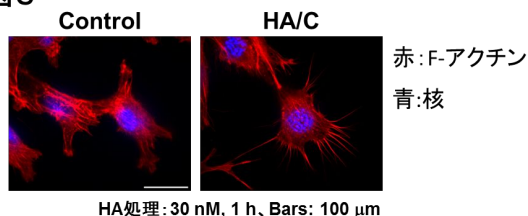
HA処理: 30nM, 8h

に GalNAc-T 遺伝子を導入することにより、a 経路のガングリオシドを発現させるとともに GM3 の発現量を減少させたところ、C 型 HA に対する感受性は減弱することが分かった。以上の結果から C 型 HA は GM3 および a 経路のガングリオシドを認識することができるが、細胞の形態変化や増殖抑制は、GM3 を介して起きていると考えられた。C 型 HA はヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞や T84 細胞に対して活性を示さないが、これらの細胞株では GM3 は発現しているもののその割合は低く、他のガングリオシド分子種が優勢に発現していた。一方で感受性を示す MDCK 細胞では GM3 が優勢に発現しており、GM3 の関与を裏付ける結果となった。

C 型 HA が GM3 に結合することによりどのようにして細胞の変化を引き起こしているかについては不明であるが、GM3 は細胞・基質間接着や細胞増殖の調節に関わることがこれまでに報告されており、C 型 HA の GM3 への結合によりそれらの機能に影響を与えていることが考えられた。また、L 細胞においては C 型 HA 処理により、細胞辺縁部において顕著なアクチン繊維の突起構造が見られた (図 3)。この観察結果は GM3 がアクチン骨格の制御にも関与しているという GM3 の新たな機能を示唆している。

C 型ポツリヌス症は牛などの家畜やトリで見出されているが、これらの動物種において毒素がどのようにして体内に取り込まれて

図3



いるかについてはほとんどわかっていない。また、本研究で見出されたC型HAによるGM3結合を介した細胞の形態変化や増殖抑制のポツリヌス症発症への寄与については不明である。しかしながら、C型HAが細胞膜上のGM3を標的として細胞障害を与えうるといふ本研究成果は、今後C型ポツリヌス症における毒素吸収機構の解析を行う上で、一つの知見を与え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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

菅原 庸 他、ポツリヌスヘマグルチンはガングリオシド結合により細胞障害活性を示す、第88回日本細菌学会総会、2015年3月26日、長良川国際会議場  
菅原 庸 他、C型ポツリヌスHAが引き起こす細胞障害活性の分子機構、第67回日本細菌学会関西支部総会、2014年11月22日、兵庫医科大学

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等: 該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菅原 庸 (SUGAWARA, Yo)

大阪大学微生物病研究所・特任助教(常勤)

研究者番号: 70452464

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: