

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860325

研究課題名(和文)ボツリヌス神経毒素結合タンパク質NTNHAの細胞層透過メカニズム

研究課題名(英文)Cell-layer transport mechanism of botulinum neurotoxin-binding protein, nontoxic nonhemagglutinin

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：経口的に摂取されたボツリヌス神経毒素は、消化管および血管を経て、最終的に神経細胞へと輸送される。この際、毒素は、腸管細胞や血管細胞を透過することになる。一方、ボツリヌス神経毒素は単独では存在せず、少なくとも1種類の無毒タンパク質“非毒非血球凝集素(NTNHA)”と複合体を形成する。本研究では、D型NTNHAが、ラット腸管細胞およびウシ血管細胞の層を透過するが、イヌの腎臓やヒトの腸管細胞は透過しないことを明らかにした。すなわち、NTNHAタンパク質が特定の細胞を透過することが明らかとなった。すなわち、ボツリヌス神経毒素はNTNHAによって体内を運搬されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Botulinum toxin (BoNT) complex (TC) traverses the gastrointestinal tract and circulation, eventually becoming localized in neuromuscular junctions. During this process, BoNT must pass through cells, thus from the intestinal lumen to the cells of the intestinal tract and blood vessels. The botulinum TC is formed by association of the BoNT with at least one nontoxic protein, nontoxic nonhemagglutinin (NTNHA). In the present work, we examined the binding and transcytosis of serotype D NTNHA protein in epithelial and endothelial cells to clarify the role played by the protein in toxin delivery. Our studies showed that NTNHA bound to and transcytosed across IEC-6 and BAEC cells. While NTNHA also bound to MDCK or Caco-2 cells, but did not traverse across MDCK or Caco-2 cells. Such specificity of NTNHA protein transcytosis may explain why only some animals are sensitive to botulinum toxin. The sensitivity depends on the toxin serotype in play, and the route of toxin delivery.

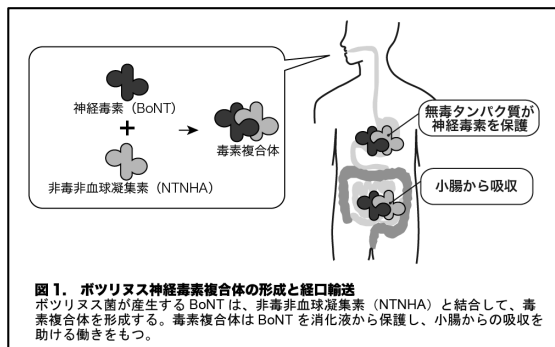
研究分野：分子生物学

キーワード：ボツリヌス食中毒 体内輸送 経口毒素

## 1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) は、ボツリヌス食中毒の原因物質であり、地球上で最も強い毒性を示す。

自然界で、BoNT は単独ではなく、無毒タンパク質と結合した毒素複合体として存在する (図 1)。毒素複合体は、汚染された食物と一緒に摂取されることで体内に侵入する。BoNT は、胃や腸などの消化管を通過するが、無毒タンパク質に保護されているため、消化液で分解されることなく、毒素としての機能を保持したまま小腸へ運ばれる (図 1)。



2012 年、申請者らは、無毒タンパク質のうち非毒非血球凝集素 (NTNHA) が、BoNT と共通の先祖タンパク質から進化したタンパク質であることを明らかにした (Inui, Sagane et al., *BBRC*, 2012)。NTNHA と BoNT は、溶液中で分子の一部が柔軟に変形し、互いに“組み合う”ように結合することで安定な複合体となる (Sagane et al., *BBRC*, 2012)。この BoNT と NTNHA の複合体は酸やプロテアーゼによる分解に対して著しく高い耐性を示す。

## 2. 研究の目的

BoNT は、小腸上皮細胞の細胞層を透過することができる (Ito, Sagane et al., *FEMS Med. Immunol. Microbiol.* 2010)。しかし、NTNHA の細胞への作用については検討されておらず、細胞層透過性についても、未解明のままであった。申請者らは、BoNT と NTNHA が共通の先祖から進化した類似タンパク質であるという知見から、NTNHA が小腸上皮細胞層を透過することを予測した。そして、実際に NTNHA も単独で小腸上皮細胞層を透過することを見出した。

このことは、NTNHA が BoNT を消化液から保護するだけでなく、小腸から血管内へと毒素を輸送する働きを持つことを示している。しかし、NTNHA タンパク質の細胞層透過のメカニズムについては、不明のままであった。そこで、申請者は、NTNHA タンパク質の細胞層透過のメカニズムを解明することを目的とし、本研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

### (1) ボツリヌス毒素複合体の産生及び精製

ボツリヌス D 型菌 4947 株 (D-4947) を透析培養法によって培養し、毒素複合体を含む培養上澄み液を得た。培養上澄み液中の毒素タンパク質は 60%飽和硫酸アンモニウムによって沈殿させた。さらに毒素タンパク質は各種カラムクロマトグラフィーによって精製した。

### (2) 組換え NTNHA タンパク質の調製

NTNHA タンパク質およびそのドメインを単位とした各種の部分タンパク質は、発現ベクター pET200-D/TOPO (Invitrogen) を用いた組換えタンパク質発現系によって作製した。His タグが連結された各種組換えタンパク質は Ni アフィニティーカラムを用いて精製した。

### (3) 細胞培養

NTNHA と BoNT の結合および透過試験に用いた細胞は、ラット小腸上皮細胞株 (IEC-6)、ヒト結腸ガン細胞株 (Caco-2)、イヌ腎臓尿管上皮細胞株 (MDCK)、およびウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) である。細胞の培養は、それぞれ常法にしたがい行った。

### (4) 細胞への結合試験

NTNHA と BoNT の細胞への結合試験は以下の通り実施した。NTNHA あるいは BoNT を培養細胞に添加し、一定時間インキュベートした。細胞に結合したタンパク質は、SDS-PAGE によって分離し、NTNHA あるいは BoNT に対する抗体によってそれぞれのタンパク質を検出した。

### (5) 細胞内への取り込み試験

NTNHA および BoNT を Cy5 によって標識した。標識したそれぞれのタンパク質を培養細胞に加え、4 で 10 分間インキュベートした後、37 で 30 分間インキュベートした。細胞内に取り込まれたタンパク質は、共焦点顕微鏡によって観察した。

### (6) 細胞層に対する透過試験

NTNHA と BoNT の細胞層に対する透過試験は以下の通り実施した。上層と下層が半透膜で仕切られた培養槽に各種細胞を播種した。細胞層で仕切られた槽の上部側に NTNHA あるいは BoNT を加え、37 で一定時間インキュベートした。その後、下層部に透過したタンパク質を回収し、SDS-PAGE によって分離した後、ウエスタンブロットによって検出した。

## 4. 研究成果

### (1) NTNHA タンパク質が透過する細胞の種類

NTNHA が結合及び透過する細胞種を明らかにするため、ラット小腸上皮細胞株 (IEC-6)、ヒト結腸ガン細胞株 (Caco-2)、イヌ腎臓尿管上皮細胞株 (MDCK)、およびウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) を用い、細胞に対する結合試験、取り込み試験、透過試験を実施し

た。

その結果、NTNHA は、すべての細胞に対して結合することが示された(図2)。一方、細胞内への取り込み試験の結果、NTNHA は、IEC-6およびBAECの細胞内に侵入していることが確認された(図3)。

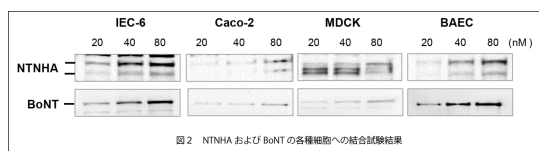


図2 NTNHA および BoNT の各種細胞への結合試験結果

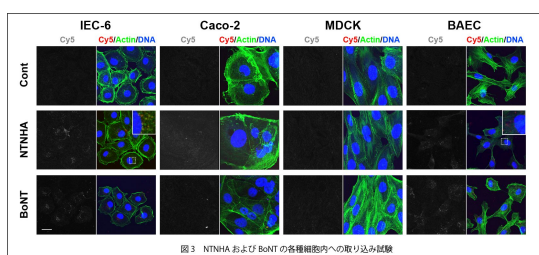


図3 NTNHA および BoNT の各種細胞内への取り込み試験

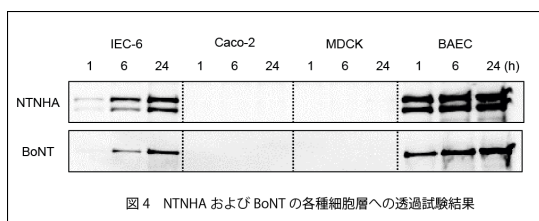


図4 NTNHA および BoNT の各種細胞層への透過試験結果

さらに、細胞層に対する透過試験の結果、取り込み試験と同様 IEC-6 および BAEC の細胞層を透過することが示された(図4)。しかしながら、MDCKおよびCaco-2に対しては、取り込みおよび透過のいずれも観察されなかった。以上の結果から、NTNHA は、透過する細胞への特異性があることが明らかとなった。ボツリヌス毒素は、経口的に摂取された後、小腸、血管を経て、循環器内に侵入し、最終的には神経細胞に達する。本研究の結果は、NTNHA が動物種特異的に、また、組織特異的に透過することを示し、毒素の体内輸送に何らかの役割を果たしていることが示された。

## (2) NTNHA の細胞透過に関わる細胞膜上分子の特定

NTNHA が、細胞に結合・透過する際、細胞膜上のどの分子を認識しているのかを明らかにするため、本実験を実施した。NTNHA の細胞結合試験において、N-アセチルノイラミン酸を添加したところ、細胞への結合が低下した。一方、細胞をノイラミニダーゼによって処理しても、細胞への NTNHA の結合量は変化しなかった。以上の結果から、NTNHA と細胞の結合には糖鎖に含まれる N-アセチルノイラミン酸が関与しているが、通常のノイラミニダーゼによって除去される末端の N-アセチルノイラミン酸以外の部分に結合している可能性が示された。

## (3) NTNHA の細胞内輸送に関わる細胞内分子

NTNHA が細胞に取り込まれ、透過する際の細胞内輸送に関わる分子を明らかにするため、細胞内で NTNHA と共局在する分子を共焦点顕微鏡によって確認した。その結果、NTNHA 分子はアクチンと共存していることが示された。すなわち、NTNHA はアクチンを介した細胞内輸送によって細胞を透過している可能性が示された。

## 引用文献

Inui K, Sagane Y, Miyata K et al., Toxic and nontoxic components of botulinum neurotoxin complex are evolved from a common ancestral zinc protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 419, 500-504

Sagane Y, Miyashita S, Miyata K et al., Small-angle X-ray scattering reveals structural dynamics of the botulinum neurotoxin associating protein, nontoxic nonhemagglutinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 425, 256-260

Ito H, Sagane Y, Miyata K et al., HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Vol. 61, No. 3, 323-331

## 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7件)

Hayashi S, Akiyama T, Sagane Y, Miyashita S, Watanebe T, Yajima S, Niwa K, Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel haemagglutinin component of the toxin complex of serotype C *Clostridium botulinum*. *Acta Crystallography F*, Vol.70, No.3, 2014, 370-373, 査読有  
DOI:10.1107/S2053230X14003094

Suzuki T, Miyashita S, Hayashi S, Miyata K, Inui K, Kondo Y, Miyazaki S, Ohyama T, Niwa K, Watanabe T, Sagane Y, Identification of the interaction region between hemagglutinin components of the botulinum toxin complex, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.65, 2014, 284-288, 査読有  
DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.01.052

Miyashita S, Niwa K, Watanabe T, Sagane Y, Host-cell specificity and transcytosis of nontoxic nonhemagglutinin protein of

botulinum neurotoxin serotype D. FEMS Microbiology Letter, Vol.357, No.2, 2014, 115-122, 査読有  
DOI:10.1111/1574-6968.12527

Miyashita S, Sagane Y, Niwa K, Watanabe T, Transport of the botulinum neurotoxin-associating protein, nontoxic nonhemagglutinin, across the rat small intestinal epithelial cell monolayer, FEMS Microbiology Letter, Vol. 346, No. 1, 2013, 73-80, 査読有  
DOI:10.1111/1574-6968.12205

Sagane Y, Hayashi S, Matsumoto T, Miyashita S, Inui K, Miyata K, Yajima S, Suzuki T, Hasegawa K, Yamano A, Nishikawa A, Ohyama T, Watanabe T, Niwa K. Sugar-induced conformational change found in the HA-33/HA-17 trimer of the botulinum toxin complex. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 438, No.3, 2013, 483-487, 査読有  
DOI:10.1016/j.bbrc.2013.07.112

Miyashita S, 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. Journal of Veterinary Medical Science, Vol.75, No.12, 2013, 1637-1642, 査読有  
DOI:10.1292/jvms.13-0164

〔学会発表〕(計7件)

林慎太郎、相根義昌、松本崇、秋山友了、宮下慎一郎、武藤信吾、山野昭人、矢嶋俊介、渡部俊弘、丹羽光一、ボツリヌスC型菌 Yoichi 株の産生する HA-33/HA-17 複合体の構造解析、第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、2015.3.26 ~ 3.28

宮下慎一郎、林慎太郎、鈴木智典、丹羽光一、渡部俊弘、相根義昌、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細胞種特異的なトランスサイトーシス、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014.10.15 ~ 10.18

林慎太郎、相根義昌、松本崇、秋山友了、宮下慎一郎、長谷川仁子、山野昭人、矢嶋俊介、渡部俊弘、丹羽光一、ボツリヌス C 型菌 Yoichi 株が産生する HA-33 の構造解析、第 87 回日本生化学会大会、京都、2014.10.15 ~ 10.18

林慎太郎、相根義昌、松本崇、秋山友了、宮下慎一郎、長谷川仁子、山野昭人、鈴木智典、矢嶋俊介、渡部俊弘、丹羽光一、ボツリヌス C 型菌 Yoichi 株の産生する HA-33/HA-17 複合体の構造、第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014.3.26 ~ 3.28

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、東京、2014.3.26 ~ 3.28

林慎太郎、相根義昌、秋山友了、宮下慎一郎、鈴木智典、矢嶋俊介、渡部俊弘、丹羽光一、ボツリヌス C 型菌 Yoichi 株が産生する HA-33 の結晶化、第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013.9.11 ~ 9.13

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 86 回日本生化学会大会、横浜、2013.9.11 ~ 9.13

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.bioindustry.nodai.ac.jp/~seika/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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