

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860287

研究課題名(和文) 宿主消化管内におけるボツリヌス毒素の動態解明

研究課題名(英文) The study of molecular assembly of botulinum neurotoxin complex in host intestine.

研究代表者

油谷 雅広 (Yutani, Masahiro)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20648810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス菌が産生するボツリヌス神経毒素(BoNT)は、重篤な食中毒である食餌性ボツリヌス症を引き起こす。BoNTは無毒タンパク質(NAPs)と複合体を形成し、NAPの機能によって宿主腸管から効率よく吸収される。本複合体はpH 7.0以上の緩衝液中でBoNTとNAPsに解離することから、弱アルカリ性である宿主腸管でも解離すると考えられてきた。

本研究では、宿主腸管に存在する宿主由来因子が、弱アルカリ性環境下で本複合体の解離を阻害することを明らかにした。このことは、宿主腸管内でも本毒素複合体が解離しないことを示唆しており、本研究によってボツリヌス食中毒の発症機構における重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Clostridium botulinum neurotoxin (BoNT) exists as progenitor toxin complexes (PTCs) with nontoxic components such as hemagglutinin (HA) and non-toxic non-HA (NTNHA). In PTC molecules, BoNT associates with NTNHA noncovalently. NTNHA protects BoNT from digestion and HA facilitates BoNT absorption in host digestive tract.

BoNT dissociates from NTNHA in weak alkaline buffer (pH > 7.0) in vitro, so that BoNT is assumed to be present as a released form in host intestine. Meanwhile, it is reported that the BoNT does not dissociate in rat intestinal fluid (pH 7.0) by sucrose gradient ultracentrifugation analysis. However, further studies were not performed.

In this research, we found that the mouse intestinal fluid fraction, which contains heat-resistant small molecular weight compounds, inhibits the dissociation between BoNT and NAPs in alkaline conditions. This result suggests that BoNT does not dissociate from NAP in host intestinal tract.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌毒素 ボツリヌス症 食中毒 感染機構

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス神経毒素 (botulinum neurotoxin, BoNT) は *Clostridium botulinum* などによって産生される 150 kDa のタンパク質性毒素で、弛緩性麻痺を惹起する。本毒素は、常に無毒成分 (neurotoxin associated proteins, NAPs) との複合体 (progenitor toxin complex, PTC) として菌体外に放出される。PTC には、含有する NAPs の構成により M-PTC、L-PTC といった分子サイズのことなるものが存在する (図 1)。ボツリヌス食中毒において、BoNT が小腸上皮を通過することは必須である。本毒素は複合体を形成することでより高い経口毒性を示す [1]。その理由として、NTNHA が胃酸や消化酵素群の分解作用から BoNT を保護すること [1]、HA が腸管上皮細胞への接着作用 (レクチン活性) を示し腸管上皮間バリア破壊作用を示すこと [2, 3] が明らかになっている。複合体の各構成成分は非共有結合によって会合しているが、およそ pH 7.0 以上の弱アルカリ性条件下では BoNT と NAP の境界面アミノ酸残基のチャージが変化することにより BoNT が速やかに解離する [4]。腸液が弱アルカリ性であることから、宿主小腸上部では本複合体は解離していると考えられてきた。一方、1970 年代に Sakaguchi らがラット腸液中 (pH 7.0) では解離せず複合体を形成したままであることを報告している [1] が、詳細な解析は行われていない。

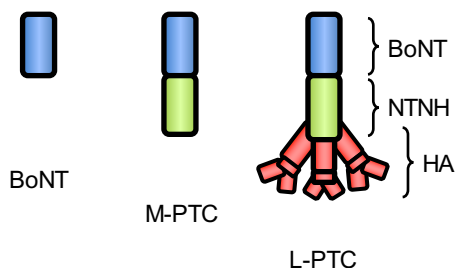


図 1、ボツリヌス神経毒素および複合体のモデル図

2. 研究の目的

BoNT が宿主腸管から吸収されること、すなわち、BoNT が腸管上皮を通過することには、NAP (特に HA) が示す活性が重要であることが明らかになってきている。また、NAP と解離した BoNT はプロテアーゼなどの分解作用に対して非常に脆弱であり、速やかに失活させられてしまうことが知られている。これらのことから、宿主腸管中で、BoNT が NAP と複合体を形成しているか否かは本食中毒の発症機構において非常に重要なポイントである。

本研究では、宿主腸液中で BoNT と NAP が解離しないという Sakaguchi らの報告を追試

するとともに、最近の分子生物学的手法を用いて本現象を詳細に解析し、解離阻害作用を示す責任分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス腸液による解離阻害活性の解析

採取したマウス腸液を用いて、解離阻害活性の有無を解析した。次いで、マウス腸液を種々の方法で分画し、どのような画分が解離阻害活性を示すかを解析した。マウス腸液に含まれる宿主由来の分子 X 合成標品を購入し、その解離阻害活性を解析した。

(2) 毒素分子と分子 X の相互作用

NMR 解析によって、L-PTC と分子 X が相互作用を示すかどうかを調べた。7 μ M L-PTC と 700 μ M 分子 X を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中に混合し、25°C で NMR 解析を行った。

(3) 分子 X の有無による、エンドプロテアーゼ溶液中での毒素の安定性への影響

L-PTC または BoNT をトリプシン・キモトリプシン、エラスターゼを含む 50 mM リン酸緩衝液 \pm 2 mM 分子 X (pH 7.8) 中で 37°C、30 分間インキュベートした。

反応後の毒素をラット (SPF, SD, メス, 8 週令) の腓腹筋に投与し、CMAP 法によって残存毒素活性を調べた。各試験データは、無処理の BoNT または L-PTC を同様の容量でラット腓腹筋に投与した時に得られた筋電位の減衰量で標準化した。

4. 研究成果

(1) 分子 X による解離阻害作用

マウス腸液を含む弱アルカリ性緩衝液中では、L-PTC から BoNT が解離しないことが明らかとなった。種々分画によって、マウス腸液中に存在する耐熱性低分子 X が本解離阻害活性の責任分子であることがわかった。

ゲルろ過クロマトグラフィーによって分子 X の解離阻害作用を確認した。分子 X を含まない弱アルカリ性緩衝液 (pH 7.8) を移動相として L-PTC、M-PTC を分析すると、それぞれ BoNT と無毒成分に分離していることを示すピークが得られた。分子 X を含む弱アルカリ性緩衝液 (pH 7.8) を移動相として分析を行った場合、それぞれの複合体を形成していることを示すピークが得られた (図 2)。

BoNTは150 kDa、NTNHAは130 kDa、NTNHA+HAは600 kDaである。例えばM-PTCについて分析した結果を見ると、pH 6.0の条件下では会合状態であるため、およそ300 kDaを示すピーク（保持容量1.6 mL付近）が検出される。pH 7.8・分子X非存在下の条件では、およそ150 kDaを示すピーク（保持容量1.8 mL付近）が検出された。これはM-PTCがBoNTとNTNHAに解離し、それらの分子サイズが近似しているためシングルピークとして検出されたと考えられた。これに対しpH 7.8・分子X存在下の条件では、M-PTCは300 kDaを示すピーク（保持容量1.6 mL付近）として検出され、会合状態を維持していることが示された。

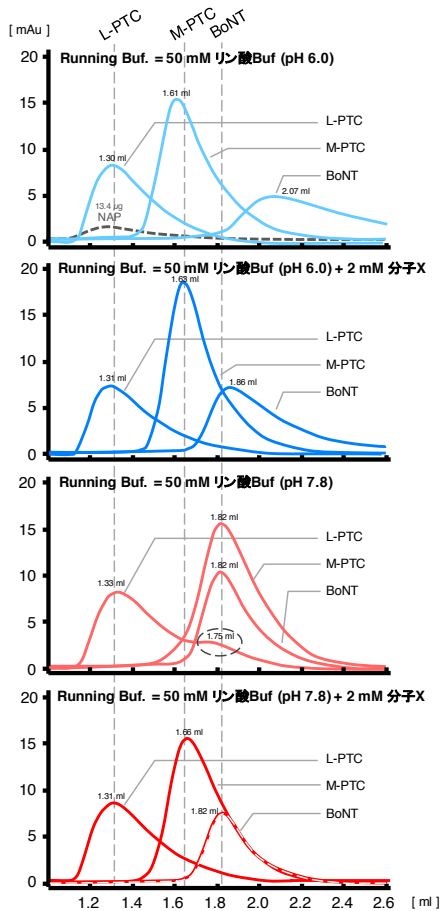


図2、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果

(2) L-PTCと分子Xは弱い相互作用を示す

本実験で行ったNMR解析は、生体高分子とそのリガンドが弱く相互作用していることを検出するために用いられる手法である($K_d = 10^{-4} \sim 10^{-3}$ M程度の相互作用の検出に用いられる)。これらの分子が弱く相互作用している場合、生体高分子からリガンドへと負のNOEが伝播し、結果的にリガンド分子を示す化学シフト値が得られる。L-PTCと分子Xを50 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)中に混合してNMR解析に供したところ、分子Xを示す化学

シフト値が得られた(図3、*部で示すシグナル)。このことから、L-PTCと分子Xは弱く相互作用していることが明らかとなった。

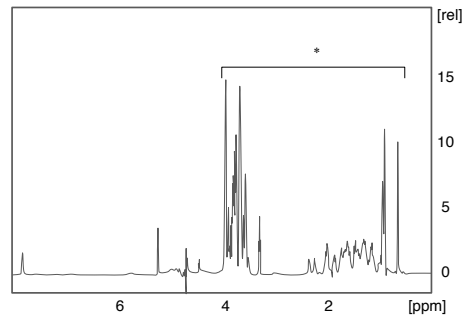


図3、NMR解析の結果

(4) 分子Xが示す解離阻害作用が、弱アルカリ性エンドプロテアーゼ溶液中でのBoNTの分解に及ぼす影響

分子Xの非存在下で3種エンドプロテアーゼ混合溶液中でBoNTおよびL-PTCをインキュベートしたとき、どちらの分子の場合も反応後の毒素活性はおよそ50%程度に低下した(図4)。分子X存在下で同様の反応を行ったとき、BoNTのみをインキュベートした場合は毒素活性はおよそ20%に低下したが、L-PTCの場合はほぼ未処理と同等の活性を示した(図4)。

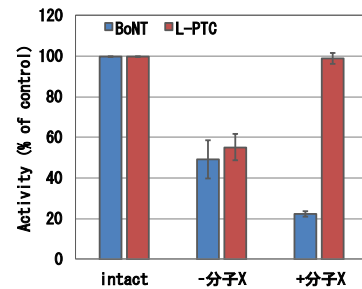


図4、分子Xによる解離阻害作用が、毒素の弱アルカリ性環境下における対エンドプロテアーゼ耐性に及ぼす影響

本研究では、マウス腸管中に存在する宿主由来分子が弱アルカリ性環境におけるボツリヌス毒素複合体の解離を阻害することを明らかにし、その因子を世界に先駆けて同定した。本結果は、宿主腸管においても同様に本毒素複合体が解離しないことを示唆しており、食餌性ボツリヌス症の病態発現機構に新たな説明を加えるものである。本研究で得られた知見を応用して腸管からの毒素吸収を抑制することが可能になれば、増悪の抑制、早期快復を目的とした新規治療法の開発が見込まれる。

<引用文献>

- [1] Sakaguchi G. (1982) *Pharmac. Ther.*, 19: 165-194
[2] Sugawara Y. et al (2010) *J. Cell Biol.*, 189: 691-700
[3] Fujinaga, Y. et al (2013) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 364: 45-59
[4] Gu S. et al (2012) *Science*, 335: 977-981

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)

①油谷 雅広, 戸所 泰人, 鳥居 恭司, 松村 拓大, 阿松 翔, 藤永 由佳子; The dissociation of botulinum neurotoxin from toxin complexes is inhibited in host intestine fluid.; 第90回日本細菌学会総会; 2017年3月19 - 21日 (仙台)

②Masahiro Yutani, Takuhiro Matsumura, Yo Sugawara, Sho Amatsu, Yukako Fujinag; Molecular assembly of botulinum neurotoxin complex in host intestine.; 13th Awaji International forum on Infection and Immunity; 2014. Sep 23 - 26 (Nara)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://bacteriology.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

油谷 雅広 (YUTANI, Masahiro)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 20648810