ボツリヌス神経毒素複合体: 毒性発現機構とその応用

【総説】

ボツリヌス神経毒素複合体：毒性発現機構とその応用

藤　永　由佳子
金沢大学医薬保健研究域医学系細菌学

Botulinum neurotoxin complex: Mechanisms of action and practical applications

Yukako　Fujinaga

は　じ　め　に

ボツリヌス神経毒素は極めて毒性の高い細菌毒素である．本毒素はヒトや様々な動物に神経，筋の麻痺を引き起こし，致死性の高い中毒であるボツリヌス症を引き起こす．食品などに混入した本毒素が経口摂取された場合，本毒素は主に小腸から体内に取り込まれ，血行性に末梢神経に到達して，食餌性ボツリヌス症を引き起こす．従って本症の発症には，神経毒素が活性を保持したまま消化管から吸収されることが必須であるが，大きなタンパク分子である本毒素が宿主の消化管から体内に侵入する機構は不明であった．我々は，本毒素は複合体として会合している無毒成分の一つであるHA (hemagglutinin，ヘマグルチニン) を介して，腸管のパイエル板に存在するM細胞に選択的に結合し，トランスサイトーシスにより体内に取り込まれることを明らかにした．M細胞の基底膜側に移行したHAは，E-cadherin特異的な機能阻害作用により細胞間バリアを可逆的に破壊し，細胞間隙からも毒素の流入を引き起こす．我々は，ボツリヌス症発症機構の研究で見出したHAの二つのユニークな機能を，粘膜ワクチンの輸送体およびE-cadherin特異的機能阻害剤として応用する研究も進めているので紹介したい．

1．ボツリヌス症

ボツリヌス症は，感染症法において『ボツリヌス菌 (*C. botulinum*) または，*C. butyricum*，*C. baratii* などが産生するボツリヌス毒素により発症する神経，筋の麻痺性疾患である』と定義されており，5つの病型に分類されている[1]．これらすべての病型のボツリヌス症は，ボツリヌス毒素が粘膜表面 (消化管，肺) あるいは創傷から血流中へ侵入することによって発症する．

1）食餌性ボツリヌス症 (ボツリヌス食中毒)：Foodborne botulism

食餌性ボツリヌス症は，低酸素状態の食品中などでボツリヌス菌が増殖し，産生された毒素を経口的に摂取することにより発症する毒素型食中毒である．食餌性ボツリヌス症の場合，経口摂取された毒素は，主に小腸上部から血流中に侵入すると考えられている[2]．血流中に入った毒素は，末梢運動神経および自律神経に作用して神経伝達物質の放出を抑制し，神経および筋の麻痺を引き起こす[3]．本病型の重症例では呼吸困難から死に至ることがある．

2）乳児ボツリヌス症：Infant botulism

乳児ボツリヌス症は，生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合，消化管内で本菌が増殖し，産生された毒素により発症する．マウス等の動物実験より，乳児期以降では腸内細菌叢を構成する細菌が本菌の定着・増殖を抑制していると考えられている[4]．乳児ボツリヌス症の感染源は，蜂蜜，コーンシロップ，ハウスダストなどが報告されている[1]．近年では感染源が特定できない症例も多い[1]．日本での報告例は年間数例と少ないが，ほとんどが孤発例であることおよび診断が困難であることから見過ごされている場合があると考えられる (本誌，阿松の稿参照)．

3）創傷ボツリヌス症：Wound botulism

創傷ボツリヌス症は，創傷部位でボツリヌス菌が増殖し，産生された毒素によって発生する稀な病型である．症例のほとんどは米国で発生しており，麻薬を不衛生な注射器を用いて注射することによって発症する例が多い[1]．

4）成人腸管定着ボツリヌス症：Adult intestinal toxemia botulism

成人や1歳以上の小児が，乳児ボツリヌス症と同じく本菌の腸管での増殖により発症し，明確な原因食品や創傷ボツリヌス症の証拠がない場合であり，稀な病型である．消化管の器質的あるいは機能的異常があるか，抗菌薬を使用している場合が多い[1]．乳児ボツリヌス症の場合と同様に見過ごされている場合があると考えられる．

5）その他原因不明：Inhalational botulism / Iatrogenic botulism

上記4つに当てはまらず毒素の侵入経路が不明である場合や，生物兵器によるアウトブレイク (空中散布や食品・飲料などへの混入) や医源性のボツリヌス症が，ここに分類される．

2. ボツリヌス神経毒素複合体の構造と機能

ボツリヌス神経毒素(botulinum neurotoxin，BoNT，血清型A−G) は，常に無毒成分 (non-toxic neurotoxin associated proteins, NAPs) と会合した毒素複合体として*C. botulinum*などにより産生される[5]．毒素複合体にはM 毒素とL 毒素がある (図1)．M 毒素はボツリヌス神経毒素に無毒性かつ赤血球凝集活性のないタンパク質であるnon-toxic non-HA (NTNHA) が結合しており，L 毒素はM 毒素に無毒性で赤血球凝集活性をもつHemagglutinin component (HA) が結合している[5,6]．ボツリヌス菌の中には，LL 毒素を産生する菌も存在する．LL 毒素はL毒素が2分子結合したものであると考えられている[5]．弱アルカリ条件 (pH 7.2付近以上) では，ボツリヌス神経毒素は無毒成分から解離する[5]．なお本稿では，ボツリヌス神経毒素とボツリヌス神経毒素複合体を区別して表現することが適切ではない場合には，これらを区別しない用語として「ボツリヌス毒素」を用いている．

1）ボツリヌス神経毒素の構造と機能

ボツリヌス神経毒素 (分子量約150k) は，結合ドメインおよびチャンネル形成ドメインを含む重鎖 (分子量約100k) と毒性ドメインを有する軽鎖 (分子量約50k) から構成されている[3]．本毒素は，結合ドメインによって，まず神経細胞に発現するガングリオシドに結合した後，タンパク質受容体を認識することで，神経細胞に高い特異性で結合する[3]．結合した毒素はエンドサイトーシスされた後，小胞内の酸性化により構造変化を起こし，チャンネル形成ドメインが小胞膜に孔を形成して，軽鎖が細胞質に移行する[3]．その後，軽鎖は，毒性ドメインの金属プロテアーゼ活性により，シナプス小胞が細胞膜と融合する際に必要な蛋白質群であるSNAREタンパク質の構成成分を選択的に切断し，神経伝達物質の放出を抑制する[3]．ボツリヌス神経毒素の血清型A−G型は，それぞれ免疫学的および機能的(神経細胞の受容体および切断するSNARE) に異なる特性を有する．

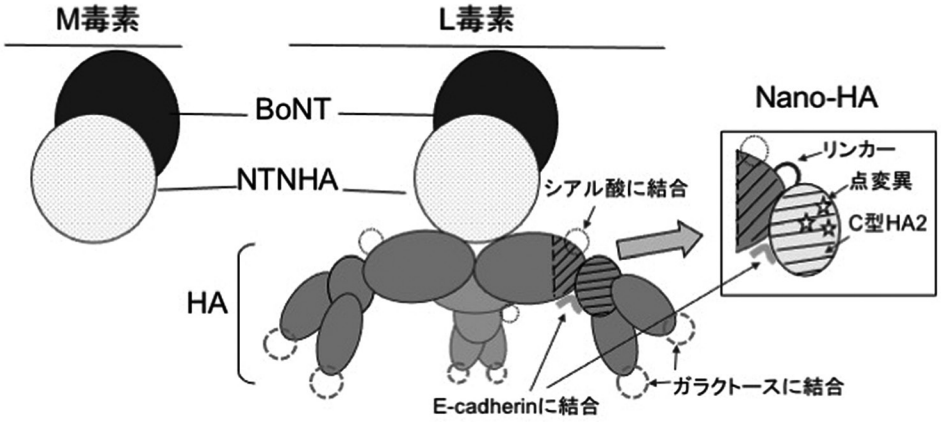

図1．ボツリヌス神経毒素複合体およびnano-HAの構造の模式図
ボツリヌス神経毒素複合体にはM毒素とL毒素が存在する．M毒素はボツリヌス神経毒素 (BoNT) にnon-toxin non-HA (NTNHA) が結合したものである．L毒素はM毒素にhemagglutinin (HA，3種のサブコンポーネントから構成される) が結合したものである．HAには，シアル酸結合部位，ガラクトース結合部位，E-cadherin結合部位がある．Nano-HAは，HAからE-cadherin結合部位を含む領域を抽出し，サブコンポーネントスワッピング，単一ポリペプチド化および数カ所のアミノ酸置換を加えて，E-cadherin機能阻害活性を増強したものである．

2）無毒成分の機能と消化管吸収機構

無毒成分のうちNTNHAにはボツリヌス神経毒素を消化液などによる分解から保護する作用があり，そのためM毒素 (血清型B型) は，神経毒素単独に比べて20倍ほど高い経口毒性を持つことが知られている[2]．さらにHAを有するL毒素 (血清型B型) はM毒素 (血清型B型) に比べて約700倍高い経口毒性を有することが知られていたがその理由は不明であった[2]．我々はHA (血清型A型およびB型) は，E-cadherinと特異的に結合しその機能を阻害することにより，上皮細胞間接着および上皮間バリアを破壊する作用を持つことを見出した[7,8]．またC型毒素のHAは，ガングリオシドGM3に結合することにより，感受性細胞に細胞障害性を示すことを明らかにした[9]．ボツリヌス菌から精製した神経毒素 (血清型B型) に大腸菌で発現・精製したNTNHAとHAを会合させた再構成毒素複合体をマウスに経口投与する*in vivo*系において，E-cadherin結合活性消失変異型 HAを含むL毒素は野生型L毒素と比較して，腹腔内投与での毒素活性は同じであるが，神経毒素の経口毒性が有意に低い (論文投稿準備中)．

また，L毒素 (血清型A型) は，*in vivo*マウスにおいて，HAの糖鎖結合活性(図1) を介して，小腸上部のパイエル板に存在するmicrofold (M) 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞にGPIアンカータンパク質のGP2の糖鎖部分を認識することにより選択的に結合し，トランスサイトーシスにより体内に取り込まれることを明らかにした[10] (図2)．本来M細胞は，細菌やウイルスといった外来微生物などを取り込み，特異的な免疫反応を誘導することにより，生体防御としての役割を担っている．M細胞直下には樹状細胞などの免疫担当細胞が存在し，M細胞を通過してきた抗原は貪食されてプロセッシングを受ける．ボツリヌス神経毒素複合体はこのような免疫機構を回避して，毒性を保った状態で血液中へ移行するのだろうか？現在は不明であるが，今後，解明していきたい．またマウス結紮腸管の実験系において，HAをloop内 (管腔側) に投与すると，M細胞の形態が顕著に崩れること，およびM細胞の周囲の細胞間バリアが破壊されることが観察された[10]．これらの結果により，HAを持つボツリヌス神経毒素複合体 (L毒素) は，M細胞を利用することにより堅牢な腸管上皮バリアを突破して基底膜側へ移行し，さらに

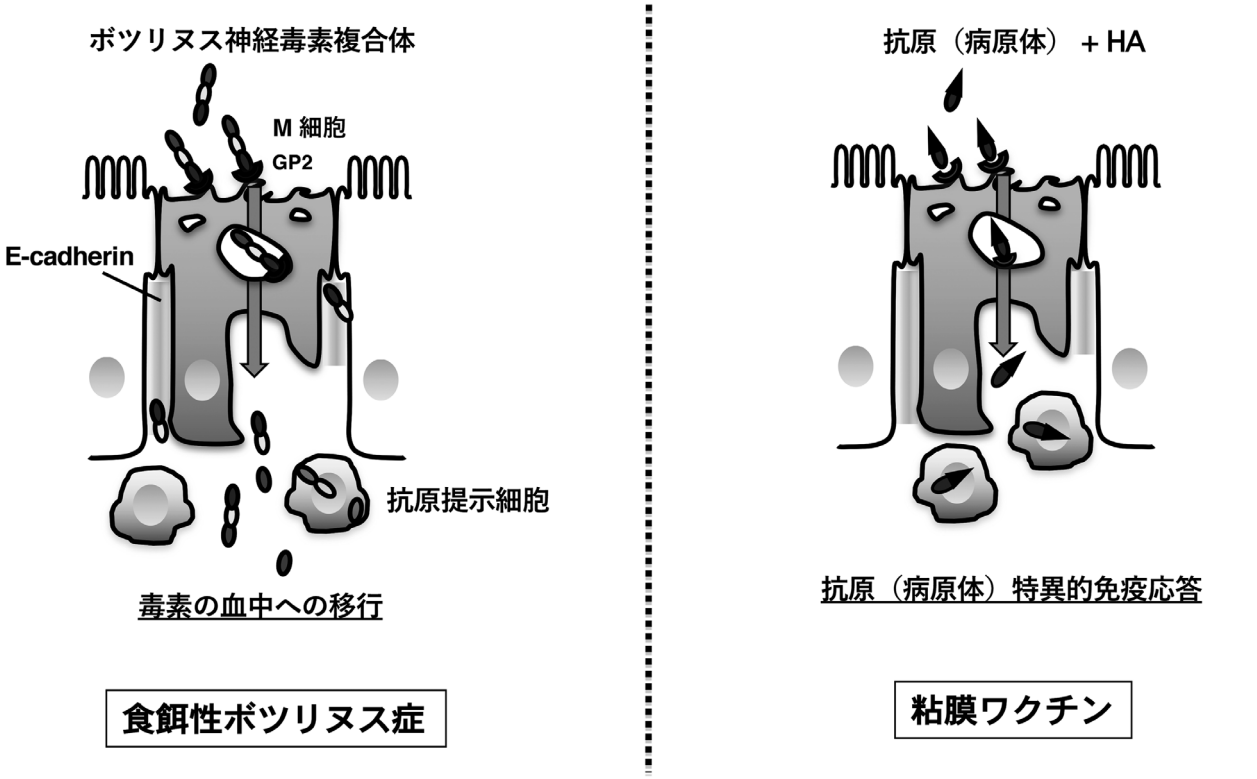

図2．ボツリヌス神経毒素複合体 (L毒素) の体内侵入機構
L毒素はHAを介してパイエル板などに存在するM細胞から体内に侵入し，食餌性ボツリヌス症を引き起こす (左図)．
インフルエンザHA抗原などの病原体抗原にボツリヌスHAを結合させると，効率よく M細胞から体内へ取り込まれて病原体特異的粘膜免疫を誘導することができる．(右図)

HAのE-cadherin機能阻害活性によりM細胞と隣接する上皮細胞の間の細胞間バリアを破壊して，より多くのL毒素を体内へ移行させることが明らかになった．

3. 粘膜ワクチン輸送体としての応用

我々は，HAが持っているM細胞から体内へ毒素複合体を輸送する機能を，粘膜ワクチンの輸送体として応用することを考えた (図2)．インフルエンザなど感染症の多くは粘膜から病原微生物が侵入し感染する．このような経粘膜感染に対する生体防御機構として粘膜免疫応答がある．粘膜免疫応答では血中IgGに加えて粘膜面に分泌型IgAを分泌して，病原体の侵入を未然に防ぐ．従って粘膜免疫を誘導できる粘膜ワクチンの開発が試みられているが，現在粘膜ワクチンの主流となっている弱毒生ワクチンは安全面などで制約が多い[11]．また不活性化抗原を用いた粘膜ワクチン開発では抗原の他にアジュバントが必要となるが，有望なアジュバントであったコレラ毒素Bサブユニットで副作用が報告されるなど実用化にいたっているものはない．ボツリヌスHAは経粘膜ワクチンの輸送体として有効であり，IgA産生を誘導することができる数少ない物質である(藤永ら，特許第6230028号)．インフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/34(N1H1)スプリット型ワクチン(SV)をボツリヌスHA(血清型B型，E-cadherin機能阻害活性欠失変異を導入)と混合してマウスに経鼻接種したところ，比較対象のコレラ毒素と同様に抗原特異的IgAおよびIgGをそれぞれ鼻腔洗浄液・気管支洗浄液および血中に誘導した (城内，藤永ら，特許第6541158号)．我々はボツリヌスHAは，粘膜から侵入する様々な病原体の粘膜ワクチンに応用可能であると考えており，現在，SARS-CoV-2ウイルスの粘膜ワクチンの開発も視野に入れて研究を行っている．

4. E-cadherin特異的阻害剤としての応用

1）ボツリヌスHAのE-cadherin阻害活性の特徴

上記2.の項で述べたように，我々はボツリヌス神経毒素複合体を構成する無毒成分の一つであるHA (野生型HA) は，E-cadherinに結合することでその機能を阻害する作用を有すること，本作用の特徴としてE-cadherinへの特異性が極めて高くかつ強力に細胞間接着を阻害することを見出した[8]．その後，LeeらによりHAとE-cadherinの共結晶構造の解明がなされ，HA中のHA2とHA3の会合でできるポケットにE-cadherinのEC1-EC2ドメインが結合することが明らかになっている[12]．一方，HAの標的分子がE-cadherinであることを明らかにする以前であったが，コロニーを形成している状態のMDCK細胞 (イヌ腎上皮由来細胞株) などの上皮系培養細胞にA型およびB型の HAを数nM以上の濃度で添加すると，数分で細胞間接着が破壊されて，コロニーがほぐれて一つ一つの細胞になることを観察した[13]．HAは酵素ではなく単にE-cadherinに結合しその機能を阻害するだけであるため，細胞障害性はなく，細胞の接触阻害 (contact inhibition) が解除されるためむしろ細胞増殖は促進される．従来より抗E-cadherin抗体などいくつかのE-cadherinに結合してその機能を阻害する分子は知られているが，これらの細胞間接着を阻害して細胞をバラバラにする活性はHAほど高くない (阿松 翔ら，未発表)．

2）iPS細胞の大量培養系への応用

我々はHAが持つこのユニークなE-cadherin特異的機能阻害作用を細胞培養技術に応用することを考えた．我々は大阪大学未来医療センターのサポートを受けて共同研究先を探し，2013年，多能性幹細胞 (iPS細胞) の大量培養系の開発に携わっている大阪大学の紀ノ岡正博教授らとの共同研究を開始した．iPS細胞を用いた細胞移植治療においては，iPS細胞から分化誘導した細胞が10^5～10^{10}個必要である．従って，iPS細胞を大量調製する技術の開発は再生医療実現のための最も重要な課題の一つである．iPS細胞の2次元および3次元培養において，細胞集塊が大きくなりすぎると集塊の内部などからの未分化逸脱細胞の出現や細胞密度増大による増殖速度の低下が起こるため，細胞集塊を適度に分割する必要がある．現状の技術では，細胞集塊をプロテアーゼや物理的方法で分割しているが，細胞障害性が大きいため培養効率を著しく下げている．生じてしまった未分化逸脱細胞の除去については，熟練した技術者が顕微鏡で逸脱細胞を見分けてピペッティングにより除去する方法をとっているのが現状である．未分化iPS細胞はClassic cadherinのうちE-cadherinのみを発現しているため，E-cadherinを特異的・可逆的に制御できれば，細胞集塊をダメージ少なく分割することが可能になり，革新的な培養方法となる．我々と紀ノ岡研の共同研究により，HAを培地に添加することで，2次元培養時に出現する未分化逸脱細胞の除去，未分化維持，および3次元培養時の細胞集塊の分割による未分化維持・増殖速度増大効果などが得られることが明らかになった[14]．

3）小型化HAの開発

ボツリヌスHA (野生型HA) は3種のサブコンポーネント (HA1～3) が会合した巨大な複合体であり，生産工程が煩雑であることおよびiPS培養に不要な機能部位を持つことという弱点がある．そこで我々は，野生型HAのE-cadherin結合部位のみを抽出して，機能部位のみをもつ小型化HAを創出することを試みた．野生型HA (血清型B型) から，HA2とHA3の会合領域に存在するE-cadherin結合部位のみを抽出して細胞間バリア低下活性を指標にE-cadherin機能阻害活性をみたところ，活性は消失していた．そこで，HA2部分を各血清型で置き換えてみたところ血清型C型のHAを用いることで活性が出現した．さらに活性を強くするため，E-cadherin結合部位以外で分子表面の存在する疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸に置換し，野生型HAの立体構造で隣接しているHA3の C末端側とHA2のN末端側をリンカーでつなぎ，single-chain化した．Nano-HAと名付けた本分子は，野生型HAの分子量の約1/10であり，単一ポリペプチドとして大腸菌で容易に発現・精製できる (特許出願中，阿松 翔ら論文投稿準備中)．今後はnano-HAとE-cadherinの共結晶解析およびnano-HAランダム変異導入を行うことにより，さらなる活性の増強を目指している．

お わ り に

我々は，細菌学の分野でボツリヌス菌およびボツリヌス神経毒素複合体の病原性に関する研究，治療用ヒト型抗毒素モノクローナル抗体の開発，腸内細菌および代謝産物による感染防御機構に関する研究などを行っている．このような基礎研究で得られた知見の幾つかは，異分野の研究者との共同研究により，新しい粘膜ワクチンの開発やiPS細胞の大量培養技術の開発に繋がっている．今後も基礎的な研究を大切にしながら，有用物質開発や新規治療法を目指す応用的な研究も積極的に進めていきたいと考えている．

謝　　辞

執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会雑誌編集委員長の杉山和久教授ならびに関係の方々に厚く御礼申し上げます．

参 考 文 献

1）国立感染症研究所 HP 病原体検出マニュアル『ボツリヌス症』，http://www.nih.go.jp/niid/ja/reference.html

2）Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* toxins. Pharmacol Ther 19: 165-194, 1982

3）Schiavo G, Matteoli M, and Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol Rev 80: 717-766, 2000

4）Wells CL, Sugiyama H, and Bland SE. Resistance of mice with limited intestinal flora to enteric colonization by *Clostridium botulinum*. J Infect Dis 146: 791-796, 1982

5）Fujinaga Y, Sugawara Y, and Matsumura T. Uptake of botulinum neurotoxin in the intestine. Curr Top Microbiol Immunol 364: 45-59, 2013

6）Amatsu S, Sugawara Y, Matsumura T, Kitadokoro K, Fujinaga Y. Crystal structure of Clostridium botulinum whole hemagglutinin reveals a huge triskelion-shaped molecular complex. J Biol chem 288: 35617-35625, 2013

7）Matsumura T, Jin Y, Kabumoto Y, Takegahara Y, Oguma, K, Lencer WI, Fujinaga. The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. Cell Microbiol 10: 355-364, 2008

8）Sugawara Y, Matsumura T, Takegahara Y, Jin Y, Tsukasaki Y, Takeichi M, Fujinaga Y. Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. J Cell Biol 189: 691-700, 2010

9）Sugawara Y, Iwamori M, Matsumura T, Yutani M, Amatsu S, Fujinaga Y. Clostridium botulinum type C hemagglutinin affects the morphology and viability of cultured mammalian cells via binding to the ganglioside GM3. FEBS J 282: 3334-3347, 2015

10) Matsumura T, Sugawara Y, Yutani M, Amatsu S, Yagita H, Kohda T, Fukuoka S, Nakamura Y, Fukuda S, Hase K, Ohno H, Fujinaga Y. Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. Nat Commun 6: 6255, 2015

11) Miquel-Clopés A, Bentley EG, Stewart JP, Carding SR. Mucosal vaccines and technology. Clin Exp Immunol. 196: 205-214, 2019

12) Lee K, Zhong X, Gu S, Kruel AM, Dorner MB, Perry K, Rummel A, Dong M, Jin R. Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex. Science 344: 1405-1410, 2014

13) Jin Y, Takegahara Y, Sugawara Y, Matsumura T, Fujinaga Y. Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins - differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C. Microbiology 155: 35-45, 2009

14) Kim MH, Kino-oka, M. A Novel Strategy for Simple and Robust Expansion of Human Pluripotent Stem Cells Using Botulinum Hemagglutinin. Adv. Exp. Med. Biol. 1077: 19-29, 2018