

ボツリヌスB型16S 毒素のヒト腸管上皮細胞への結合活性の解析

金 英 姫

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病原細菌学
 大阪大学微生物病研究所附属感染症国際研究センター 感染細胞生物学グループ
 (指導：小熊恵二教授)

Characterization of the binding of botulinum type B 16S toxin to human intestinal epithelial cells

Yingji Jin

Department of Bacteriology, Okayama University Graduate School of Medicine,
 Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan
 Laboratory for Infection Cell Biology, International Research Center for Infectious diseases,
 Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan
 (Director : Prof. K. Oguma)

Botulinum neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* type B is a complex of 12S and 16S toxins. 12S toxin consists of a neurotoxin and a nontoxic non-HA (NTNH). The 16S toxin consists of a neurotoxin, an NTNH, and a hemagglutinin (HA). Food-borne botulism is caused by these complex toxins, which are ingested orally and absorbed from the digestive tract across the epithelial barrier lining the gut.

Here we show that the type B 16S toxin, but not the 12S toxin or the neurotoxin, binds to the T84 human intestinal epithelial cell line. We also demonstrate that the HA moiety in the 16S toxin mediates the toxin binding to the cells. The carbohydrates containing a galactose moiety inhibited the binding of the 16S toxin to the T84 cells, and neuraminidase treatment of the cells increased the 16S toxin binding. The binding of the 16S toxin to the neuraminidase-treated cells was also inhibited by carbohydrates containing a galactose moiety. These results suggest that the type B 16S toxin binds to human intestinal epithelial cells via the galactose moiety in the carbohydrate chain on the cell surface.

キーワード：ボツリヌス毒素 (botulinus toxin), *Clostridium botulinum*, ボツリヌス中毒 (botulism), T84細胞 (T84 cell), ガラクトース (galactose)

緒 言

ボツリヌス神経毒素 (7S 毒素, 約150kDa のタンパク質) はボツリヌス食中毒を引き起こす。本毒素はメタロエンドペプチダーゼであり, 神経細胞に取り込まれた場合シナプス小胞とシナプス前膜の融合に関わるタンパク質群である SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) を特異的に切断することにより神経伝達物質の放出を抑制する¹⁾。個体 (ヒトあるいは動物) においては, 末梢運動神経の弛緩性麻痺を引き起こし呼吸困難による致死をもたらす。本毒素は血清型によ

ってA~G型の7種類があるが, ヒトに中毒を起こすのは主に, A, B, E, F型である²⁾。本食中毒発症には, 神経毒素が消化管から吸収され, 血中に移行し末梢神経に到達することが必要である。このような巨大分子である神経毒素が体内に侵入する際の最初の重要な関門は消化管上皮細胞のバリアであるが, 本毒素がどのように消化管上皮バリアを通過するのかわ不明である。

一方で神経毒素は常に無毒性のタンパク質群(無毒成分)と結合した毒素複合体 (progenitor toxin, 12S, 16S あるいは19S 毒素) としてボツリヌス菌により産生される³⁾。12S 毒素は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 nontoxic non-HA (NTNH) が結合しており, 16S 毒素は12S 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。19S 毒素は16S 毒素が2分子結合したものである²⁾。A型は12S, 16S, 19S 毒素を, B, C, D型は12S と16S 毒素を, E,

平成18年12月11日受理
 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3番1号
 大阪大学微生物病研究所附属感染症国際研究センター
 感染細胞生物学グループ
 電話：06-6879-4250 FAX：06-6879-4252
 E-mail：yingji@biken.osaka-u.ac.jp

F型は12S毒素のみ、G型は16S毒素のみを産生する。神経毒素複合体は神経毒素単独に比べて経口毒性が飛躍的に高いことが知られている。その原因として以前に無毒成分には神経毒素を消化液から保護する作用があり、そのために複合体毒素は経口毒性が強いことが示された³⁾。我々はこれに加えて無毒成分が腸管上皮細胞に積極的に作用を及ぼしている可能性について検討することにした。

材料と方法

1. ボツリヌスB型各種毒素の精製

B型16S毒素、12S毒素、神経毒素は、既報⁴⁾に従い、*C. botulinum* type B strain lamanna より精製した。

2. 毒素の細胞結合活性の測定

ヒト大腸がん由来細胞T84(米国ハーバード大学, W. I. Lencer 先生より供与)を96 well plate に播き、8~10日後に実験に使用した。細胞を氷冷 HBSS-HEPES (pH 6.0) で洗浄し、2% BSA 含有 HBSS-HEPES (pH 6.0) でブロッキングを行った(4℃, 1時間)。その後、各種の毒素を添加し、4℃, 1時間静置した。その後氷冷 HBSS-HEPES (pH 6.0) で洗浄し、一次抗体としてウサギ抗神経毒素ポリクローナル抗体と4℃, 1時間反応させ、氷冷 HBSS-HEPES (pH 6.0) で洗浄し、二次抗体として HRP ラベル抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) と4℃, 1時間反応させた。氷冷 HBSS-HEPES (pH 6.0) で洗浄し、ABTS 溶液 (Roche) と37℃, 20分反応させた後、

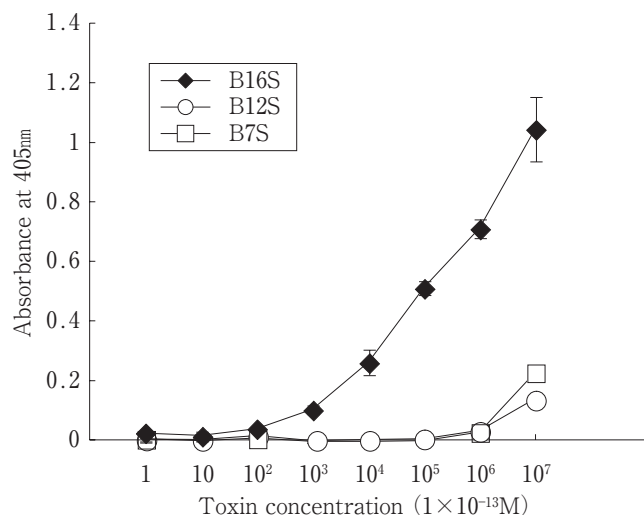


図1 B型16S, 12S および 7S 毒素のT84細胞への結合活性
T84細胞に各種毒素を添加して4℃1時間インキュベートした。その後、抗B型神経毒素抗体、HRP ラベルウサギ抗 IgG 抗体で反応させ、吸光度を405nmで測定した。実験結果は blank 値を差し引いた405nmの吸光度(材料と方法の項参照)を神経毒素の結合量として示した。(means±SD, n=3)

405nmの吸光度を測定した。図の縦軸は毒素処理をしていない細胞を同様に処理して得られた吸光度を blank として差し引いた値である。糖の結合阻害活性は毒素と各種の糖(0-100mM)を混合し、4℃, 40分インキュベートし、その後結合活性を測定した。

biotin ラベルしたB型16S毒素(Biotin-B16S)の細胞への結合は、HRP-streptavidin (Jackson Immuno Research) と反応させて測定した。

3. 細胞の neuraminidase 処理

T84細胞の培地を除去し、4%(w/v) paraformaldehyde (in HBSS-HEPES pH 6.0) にて室温20分処理し、固定した。その後1M glycine (in HBSS-HEPES pH 6.0) で室温1時間処理し、洗浄後、0.1U/ml neuraminidase (in 0.2M sodium acetate buffer pH 5.0, Nakarai) で37℃, 16時間処理した。細胞を洗浄後、各種毒素の結合実験に用いた。

4. コンフォーカル顕微鏡観察

Transwell (Corning) で培養したT84細胞を用いた。細胞を氷冷 HBSS-HEPES (pH 6.0) で洗浄後、Alexa488でラベルしたB型神経毒素、12S毒素、および16S毒素各5nMを上皮細胞の apical から添加し、4℃, 1時間静置した。その後細胞を洗浄し、4%(w/v) paraformaldehyde (in HBSS-HEPES pH 6.0) で室温20分固定した。細胞の観察は、コンフォーカル顕微鏡(CSU21横河, IX71オリンパス)で行った。

結果

ヒト大腸がん由来細胞株であるT84細胞を用い、B型各種毒素の結合を定量的に解析した(図1)。その結果、12S毒素と神経毒素はほとんど結合活性を示さなかったが、16S毒素は用量依存的に結合活性の増加を示した。16S毒素の結合親和性は、12S毒素と神経毒素に比べ、約10³~10⁴倍高いことが示された。

図1で観察されたB型各種毒素のT84細胞への結合の状態を免疫細胞染色にて可視化した(図2)。B7S毒素(神経毒素)(5×10⁻⁹M)、およびB12S毒素(5×10⁻⁹M)の結合はほとんど観察されなかったが、B16S毒素(5×10⁻⁹M)は細胞表面に点状に結合していることが観察された。

次にBiotin-B16S(1×10⁻⁹M)を用い、B16S毒素およびB型毒素のHAコンポーネント(BHA)の競合阻害効果について検討した(図3)。約1,000倍高いモル濃度の16S毒素により、Biotin-B16Sの結合は10%程度まで阻害された。また約600倍高いモル濃度のHAによってもBiotin-B16Sの結合は20%程度まで阻害された。一方、陰

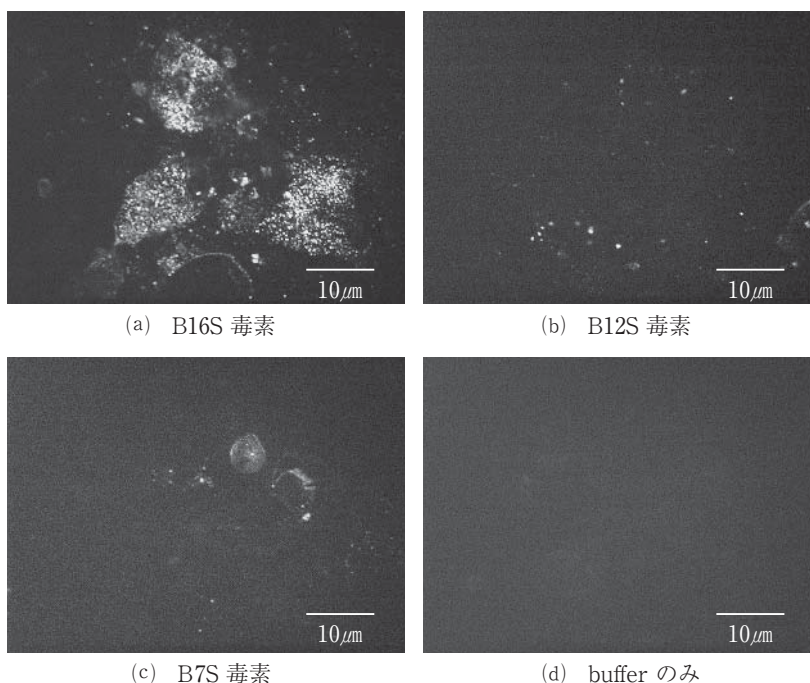


図2 B型16S (パネル a), 12S (パネル b) および 7S 毒素 (パネル c) のT84細胞への結合のイメージング解析
T84細胞に Alexa488でラベルした各種毒素を添加して4℃1時間インキュベートした。その後4% paraformaldehyde で固定してコンフォーカル顕微鏡で観察した。

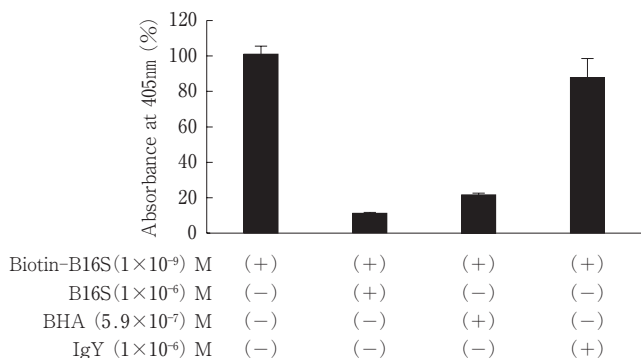


図3 Biotin-B16S の T84細胞への結合における B型16S 毒素、B型 HA および IgY の阻害効果

Biotin-B16S (1×10^{-9} M) を B16S 毒素 (1×10^{-6} M), BHA (5.9×10^{-7} M), IgY (1×10^{-6} M) と混合し, T84細胞に添加して4℃, 1時間インキュベートし, その後毒素の結合量を HRP-streptavidin を用いて測定した。実験結果は Biotin-B16S 毒素 (1×10^{-9} M) 単独の結合量を100%として換算した。(means \pm SD, n = 3)

性コントロールの IgY を1,000倍高いモル濃度添加した場合はほとんど阻害しなかった。以上の結果より B16S 毒素 (1×10^{-9} M) の結合は特異的結合であり, その結合活性は HA が担っていることが明らかとなった。

次に B16S 毒素の T84細胞への結合様式について検討した。16S 毒素中の HA は糖鎖を認識することが知られている。そこで各種の単糖および二糖で B16S 毒素を前処理し

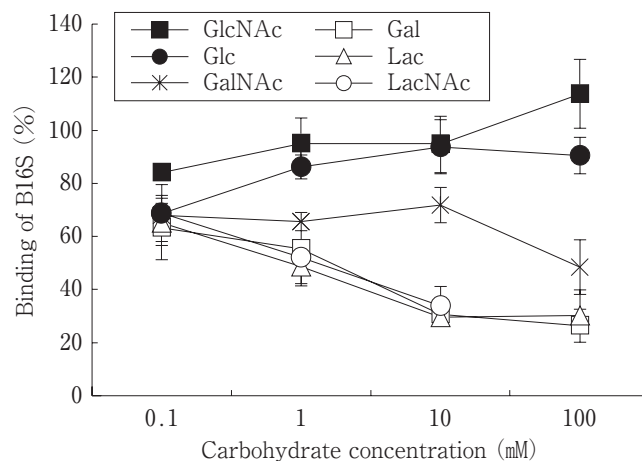


図4 B型16S 毒素の T84細胞への結合における各種糖の阻害効果

B16S 毒素 (1×10^{-9} M) を各種糖《d-galactose (Gal) (0-100 mM), lactose (Lac) (0-100mM), N-acetyl-d-galactosamine (GalNAc) (0-100mM), N-acetyl-d-lactosamine (LacNAc) (0-10mM), d-glucose (Glc) (0-100mM), N-acetyl-d-glucosamine (GlcNAc) (0-100mM)》と混合して4℃40分インキュベートした。その後 T84細胞に添加し, 毒素の結合量を抗神経毒素抗体を用いて測定した。実験結果は B16S 毒素 (1×10^{-9} M) (0 mM 糖) の結合量を100%として換算した。(means \pm SD, n = 3)

た後, T84細胞に添加し, 各種糖の結合阻害効果について解析した (図4)。その結果, galactose, lactose, N-acetyl-galactosamine, N-acetyl-lactosamine で, 濃度依存

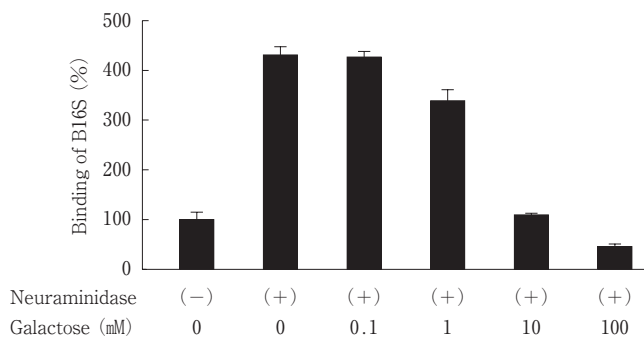


図5 B型16S毒素のneuraminidase処理したT84細胞への結合とgalactoseによる結合阻害

T84細胞を4% paraformaldehydeで固定後, neuraminidase処理した. B16S毒素 (1×10^{-9} M) をgalactose (0-100mM) と混合して4℃40分インキュベートした. その後毒素溶液をT84細胞に添加し, 毒素の結合量を抗神経毒素抗体を用いて測定した. 実験結果はB16S毒素 (1×10^{-9} M) (neuraminidase無処理, galactose 0 mM)の結合量を100%として換算した. (means \pm SD, n = 3)

的に阻害効果が認められた. galactose, lactose, N-acetyl-lactosamineの阻害効果はほぼ同等であったが, N-acetyl-galactosamineの阻害効果は他のgalactose含有糖に比して若干低かった. 一方, glucoseとN-acetyl-glucosamineは全く阻害効果を示さなかった.

T84細胞をneuraminidase処理することにより, B16S毒素の結合における細胞膜表面の糖鎖末端のシアル酸の関与について検討した(図5). neuraminidase処理により糖鎖末端のシアル酸を除去すると, B16S毒素の細胞への結合量は無処理細胞に比して約4倍増加した. neuraminidase処理により増加したB16S毒素の結合は, galactoseにより用量依存的に阻害された. 10mM galactoseではほぼ完全にneuraminidase処理による増加分のB16S毒素の結合が阻害された.

考 察

今回の解析により, ヒト腸管上皮細胞T84細胞においてHAを持つB型16S毒素はHAを持たない12S毒素および神経毒素に比べ, 約 $10^3 \sim 10^4$ 倍高い結合親和性で結合することが明らかになった. 以前より他の血清型(A型及びC型)の毒素においてHAにモルモット小腸上皮への結合活性があることが, 腸管切片の免疫組織染色により示唆されていたが定量性が乏しく, その結合様式の生化学的解析が困難であった⁵⁻⁷⁾. 本研究では, B型各種毒素を比較してヒト由来の腸管上皮細胞における結合を定量的に明らかにした.

A型およびB型はヒトのボツリヌス症で多く, C型は齧歯類などの動物で多く見られる²⁾. このような血清型によ

るボツリヌス食中毒発症頻度の動物種差が起こる原因はよく分かっていない. 今回確立したヒト腸管上皮細胞のassay系に基づき, 今後は齧歯類などの腸管上皮由来の培養細胞と比較することにより, 各血清型の毒素複合体の種特異的な毒素の腸管吸収機構についての解析が可能になると考えられる.

B16S毒素のT84細胞への結合は, B16S毒素中のHAコンポーネント(BHA)が担っていることが競合阻害実験より明らかになった. 以前よりBHAにはlactose(Gal β 1-4Glc)に結合する活性が有ることが示されていた⁴⁾. 今回の検討によりHAが腸管上皮細胞に結合する活性があることが明らかになった. この腸管への結合は, galactoseやlactoseなどのgalactoseを含有する糖鎖により結合の阻害がみられたことから, B16S毒素のT84細胞への結合には, 細胞表面上のgalactose残基含有糖鎖が存在することが重要であると考えられる. A型16S毒素とヒト腸管細胞の結合には, 細胞表面のN-acetyl-lactosamineが強く関与していることが示されている⁸⁾. B型16S毒素の場合は, N-acetyl-lactosamineとgalactoseおよびlactoseの競合阻害効果がほぼ同等であったことから, B型16S毒素とA型16S毒素で認識するgalactose含有糖鎖の部分が若干異なると考えられる.

C型16S毒素は, 腸管上皮細胞膜上のmucinにシアル酸を介して結合すること⁹⁾, そして毒素のinternalizationが起こること¹⁰⁾が報告されている. C型16S毒素の腸管上皮細胞への結合はneuraminidase処理によりほぼ完全に消失する^{5,6)}. B型16S毒素はC型16S毒素と異なり, neuraminidase処理細胞でその結合量が著しく増加し, galactoseで結合が著しく阻害された. このことから, 腸管上皮細胞に結合したB型16S毒素は, C型16S毒素と異なり, galactoseを含む糖タンパク質あるいは糖脂質に結合し, 異なる経路でinternalizationされると考えられる. 本研究は, ヒトに食中毒を引き起こすA型およびB型ボツリヌス神経毒素複合体の腸管吸収機構の解明の糸口になると期待される.

結 論

ボツリヌスB型16S毒素のT84細胞への結合はB型16S毒素中のHAが担っていること, およびこの結合は細胞表面のgalactose含有糖鎖を認識して行われていることが示唆された.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導とご校閲を賜った恩師岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病原細菌学教室の小熊恵二教授に深謝致します

す。また直接実験の指導をいただいた大阪大学微生物病研究所附属感染症国際研究センター 感染細胞生物学グループの藤永由佳子先生に感謝致します。

文 献

- 1) Schiavo G, et al.: Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* (2000) **80**, 717-766.
- 2) Oguma K, et al.: Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. *J Toxicol Toxin Rev* (1999) **18**, 17-34.
- 3) Sakaguchi G, et al.: Structure and function of botulinum toxins ; in *Bacterial Protein Toxins*, London, Academic press (1984) pp 435-443.
- 4) Arimitsu H, et al.: Purification of fully activated *Clostridium botulinum* serotype B toxin for treatment of patients with dystonia. *Infect Immun* (2003) **71**, 1599-1603.
- 5) Fujinaga Y, et al.: The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology* (1997) **143**, 3841-3847.
- 6) Fujinaga Y, et al.: Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology* (2004) **150**, 1529-1538.
- 7) Fujinaga Y, et al.: Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS Lett* (2000) **467**, 179-183.
- 8) Kojima S, et al.: *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin binds to Intestine-407 cells via *N*-acetylglucosamine moiety. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **331**, 571-576.
- 9) Nishikawa A, et al.: The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) **319**, 327-333.
- 10) Uotsu N, et al.: Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1763**, 120-128.