

東京農業大学

博士論文

ボツリヌス C 型菌 Yoichi 株が産生する毒素複合体の  
特異な翻訳後修飾とその経口毒性に関する研究

指導教授 相根 義昌

令和 5 年 3 月 17 日  
東京農業大学大学院  
生物産業学研究科 生物産業学専攻  
唐津 修羅

## 目次

<b>第1章 序論</b> .....	<b>3</b>
1. ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素 .....	3
2. ボツリヌス菌の分類 .....	4
3. ボツリヌス神経毒素について .....	4
4. ボツリヌス毒素複合体 .....	6
5. ボツリヌス毒素の抗原性 .....	6
6. ボツリヌス毒素複合体の血球凝集活性 .....	8
7. 本論文の構成 .....	9
<b>第2章 組換え体 C-Yoichi HA-33 の作製</b> .....	<b>11</b>
第1節 緒言 .....	11
第2節 実験材料および方法 .....	13
第3節 実験結果 .....	25
1. vHA-33 の導入、形質転換およびシーケンス解析 .....	25
2. vHA-33 の培養および精製 .....	25
3. HA-HA-33-FLAG (dual-tag HA-33) の導入、形質転換およびシーケンス解析 .....	26
4. HA-HA-33-FLAG (dual-tag HA-33) の培養および精製 .....	26
5. HA-33/HA-17 の導入、形質転換およびシーケンス解析 .....	26
6. HA-33/HA-17 の培養および精製 .....	27
7. MBP-tag vHA-33 の作製および精製 .....	27
第4節 考察 .....	29
第5節 要約 .....	31
<b>第3章 組換え体 C-Yoichi HA-33 の切断試験</b> .....	<b>40</b>
第1節 緒言 .....	40
第2節 実験方法・材料 .....	42
第3節 結果 .....	49
1. HA-33 の自己消化 .....	49
2. Trypsin の組換え体 dual-tag HA-33 切断能 .....	49
3. ボツリヌス菌培養溶液成分による HA-33 の切断 .....	49
4. ボツリヌス菌 菌体成分による C-Yoichi HA-33 の切断 .....	50
5. ボツリヌス菌体成分による C-Yoichi HA-33 の切断に対する EDTA の効果 .....	50

第4節 考察.....	51
第5節 要約.....	53
<b>第4章 C-Yoichi および C-St 毒素複合体の細胞結合性.....</b>	<b>61</b>
第1節 緒言.....	61
第2節 実験方法.....	62
第3節 実験結果.....	64
1. C-Yoichi および C-St 由来 PTC の IEC-6 細胞結合性.....	64
2. C-Yoichi および C-St 由来 PTC の NDase 処理を行なった IEC-6 への結合性.....	64
3. C-Yoichi および C-St 由来 PTC の NDase 処理を行なった IEC-6 細胞への糖結合阻害試験.....	64
第4節 考察.....	66
第5節 要旨.....	68
<b>第5章 C-Yoichi および C-St 毒素複合体のマウス腹腔内および経口毒性.....</b>	<b>72</b>
第1節 緒言.....	72
第2節 実験方法.....	74
第3節 実験結果.....	77
1. 培養神経細胞.....	77
2. マウス腹腔内毒性試験.....	77
3. マウス経口毒性試験.....	78
4. C-Yoichi 由来 PTC のマウス経口毒性糖阻害試験.....	78
第4節 考察.....	80
第5節 要約.....	82
<b>第6章 総括.....</b>	<b>90</b>
<b>第7章 結言.....</b>	<b>95</b>
引用文献.....	96
謝辞.....	108
Abstract.....	109

## 第1章 序論

### 1. ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) はグラム陽性、偏性嫌気性の桿菌であり、耐熱性の芽胞を形成する。ボツリヌス菌は世界の多くの地域に分布しており、土壌および水生環境では、芽胞として存在する。ボツリヌス菌の発見には保存食品の普及が密接に関わっており、18世紀末のヨーロッパにまで遡る。この時期は、長期的な食品貯蔵を維持するために、塩漬ハムやソーセージなど肉を原料とした保存食品が一般人に普及し始めた時代であった。その頃、致命率の高い食中毒が南ドイツを中心に多発し、この食中毒がボツリヌス中毒であったと考えられるとする報告が、ドイツの Justinus Kerner によって発表された。彼はボツリヌス毒素をソーセージ毒素と呼んだ (Erbguth, F. J., & Naumann, M., 1999)。1897年 Ghent 大学の van Ermengem 教授はベルギーの Ellezelles の町で起こった食中毒の原因食である自家製のハムと患者から嫌気性有芽胞細菌を分離した。この細菌は培養液中に極めて強力な毒素を産生した。この培養上清をマウス、モルモットに投与すると、この中毒で死亡した患者と同様の神経麻痺の症状を呈して斃死した。彼は、この細菌を *Bacillus botulinus* と命名した。ボツリヌス (botulinus) はラテン語でソーセージを意味し、細菌の形状がソーセージの形に似ていたためではなく、先のソーセージ毒素と命名された経緯およびその病理学的関連のためである (Ermengem, E.V., 1897)。後に、アメリカ細菌学会の分類に関する委員会で *Clostridium botulinum* に改名された (Winslow, C. E., et al., 1917)。

## 2. ボツリヌス菌の分類

ボツリヌス毒素を産生するボツリヌス菌は抗原性の差異により A~G 型に分けられる一方、毒素型とは関係なく、タンパク質および糖分解性によりグループ I~IV に分類されることもある (Hatheway, C. L., 1990)。

ヒトのボツリヌス中毒に最も関連するボツリヌス菌株であるグループ I はカゼインを分解し、ゼラチンを液化し、グルコースを分解する。すなわち、グループ I に属する菌株は、タンパク質分解性の A、B および F 型菌である。また、グループ II はカゼインを分解せず、ゼラチンを液化し、グルコースを分解する。すなわち、タンパク質非分解性の B、E および F 型菌がこのグループに含まれる。動物のボツリヌス中毒に最も関連するグループ III は C および D 型を含み、カゼインを分解せず、ゼラチンを液化し、グルコースを分解する。これまでに、ボツリヌス中毒の発症例のないグループ IV は G 型菌のみで、カゼインを分解し、ゼラチンを液化するが、グルコースを分解しないことが知られている。

## 3. ボツリヌス神経毒素について

ボツリヌス神経毒素 (botulinum neurotoxin: BoNT) と呼ばれる毒素成分は、全ての型の菌体内で分子量 150 kDa の 1 本鎖ポリペプチドとして発現し、菌体融解時に放出される。BoNT は同時に放出されるタンパク質分解酵素により、Nicking を生じ (Felber, E. S., 2006)、ジスルフィド結合によって結合された 50 kDa の軽鎖 (Light chain) および 100 kDa の重鎖 (Heavy chain) からなる 2 本鎖ポリペプチドに翻訳後修飾される (Li, B., et al., 2010)。BoNT の軽鎖は Zn 依存性エンドペプチターゼであり、アセチルコリン含有小胞が運動ニューロンの末

端膜と融合するのを阻止し、弛緩性の筋肉麻痺を引き起こす (Nigam, P. K., & Nigam, A., 2010)。BoNT は神経細胞内でジスルフィド結合の還元を受け、軽鎖が遊離することで毒性が発現する。しかし、還元処理によって分離された BoNT の軽鎖あるいは重鎖をそれぞれの動物に投与しても毒性を示さない。すなわち、全長 BoNT が動物に対して毒性を発現するために必要であることを示している。

BoNT は末梢神経で重鎖の C 末端領域を介して、神経細胞膜に結合し、エンドサイトーシスによって神経細胞内に侵入する (Li, B., et al., 2010) (Dressler, D., & Saberi, F. A., 2005)。BoNT はエンドソーム内で還元を受け (Montecucco, C., & Molgó, J., 2005)、軽鎖が神経細胞内に移行する。BoNT の軽鎖は SNARE タンパク質の特異的なタンパク質を切断し、シナプス小胞のシナプス前膜への融合が阻止され、アセチルコリンの放出を阻止する (Dressler, D., & Saberi, F. A., 2005)。

神経筋接合部でのアセチルコリンの放出は SNARE タンパク質 (VAMP、SNAP-25 およびシンタキシン) を媒介することで、シナプス小胞のアセチルコリンがシナプス前膜と融合する (Barr, J. R., et al., 2005)。BoNT の軽鎖は、SNARE タンパク質のいずれかを分解する。B、D、F および G 型は VAMP を切断し、A、C および E 型は SNAP-25 を切断する。また、C 型はシンタキシンも切断する。

近年新たに見出された X 型 BoNT は VAMP1、VAMP3、VAMP2、VAMP4、VAMP5 および Ykt6 を切断することが示されている (Zhang, S., et al., 2017)。その結果、アセチルコリンの放出が阻害され、筋肉麻痺を引き起こす。

#### 4. ボツリヌス毒素複合体

BoNT は自然界や培養液中では単独で存在せず、非毒非血球凝集素 (nontoxic nonhemagglutinin: NTNHA) および血球凝集素 (hemagglutinin: HA-33、HA-17 および HA-70) の無毒タンパク質と会合した巨大な毒素複合体 (progenitor toxin complex; PTC) として存在する。PTC は、主に 3 種の形態を持つ。BoNT と NTNHA が結合した 300 kDa の M-PTC (A-F 型)、M-PTC にさらに 3 種の HA 成分が会合した 750 kDa の L-PTC (A-D および G 型) さらに L-PTC が 2 分子重合したと考えられる LL-PTC (A 型) の 3 種類が存在する (Sugii, S., & Sakaguchi, G., 1975) (Yao, G., et al., 2014) (Inoue, K., et al., 1996) (Kalb, S. R., et al., 2015)。L-PTC におけるそれぞれのタンパク質 (BoNT:NTNHA:HA-70:HA-17:HA-33) の比率は 1:1:3:3:6 である (Hasegawa, K., et al., 2007)。経口摂取された PTC は無毒タンパク質によって消化管の酸性やプロテアーゼから保護され、毒素が消化管から吸収される (Fujinaga, Y., et al., 2004) (Fujinaga, Y., et al., 1997)。

#### 5. ボツリヌス毒素の抗原性

ボツリヌス神経毒素は抗原性の違いにより A~G の 7 型に分類される。ボツリヌス神経毒素は型により動物の感受性は異なるが薬理作用は類似している。ヒトボツリヌス中毒は、主に A、B、E および F 型毒素によって引き起こされ、C および D 型毒素は家畜や鳥類の中毒を引き起こす (Jahn, R., & Niemann, H., 1994)。G 型は南米の土壌中から分離されたボツリヌス菌の産生による毒素のもので麻痺性疾患あるいは中毒による死亡は明確に報告されていない (Gimenez, D., & Ciccarelli, A. S., 1970) (Sonnabend, O. A., et al., 1981)。

Burkeらは、抗原的に識別可能なボツリヌス毒素をA型、およびB型と命名した (Burke, G. S., 1919)。その後、タイプ特異的なモノクローナルボツリヌス抗毒素によるマウスバイオアッセイにおける交差中和がないことを特徴とするいくつかの毒素タイプの現在のアルファベット順の指定が確立された (National Center for Infectious Diseases (U.S.), Division of Bacterial and Mycotic Diseases., 1998)。1922年～1970年にかけてC、D、E、FおよびGの5種類が発見された (Bengtson, I. A., 1922) (Gunnison, J. B., & Meyer, K. F., 1929) (Hazen, E. L., 1937) (Gunnison, J. B., et al., 1936) (Moller, V., & Scheibel, I., 1960) (Gimenez, D., & Ciccarelli, A. S., 1970)。G型による中毒はA～G型のBoNTは抗原性が異なるために異なるタンパク質とされてきた。また、Ogumaらの研究により、CおよびD型BoNTの間には多くの共通する抗原部位が存在すると報告し、CおよびD型BoNTの重鎖および軽鎖を抗原として多数のモノクローナル抗体を作成した (Oguma, K., et al., 1985)。Mellingらは、A型BoNTモノクローナル抗体がBおよびE型BoNTと明らかに反応することを示した (Melling, J., et al., 1988)。近年、新たにH型が報告された。すなわちIBCA10-7060株は、H型BoNTを産生するとされた (Dover, N., et al., 2014) (Barash, J. R., & Arnon, S. S., 2014)。しかし、H型BoNTはのちにF型とA型のモザイクBoNTとされ、A型BoNT抗体によって中和されることが報告された (Maslanka, S. E., et al., 2016)。さらに近年、X型BoNTが発見され、X型BoNTは既知の抗体によって認識されないことが報告されている (Zhang, S., et al., 2017)。



## 6. ボツリヌス毒素複合体の血球凝集活性

ボツリヌス PTC のうち、HA 成分を有する L-PTC は血球凝集活性 (HA 活性) を持つ。一方、HA 成分を持たない M-PTC は HA 活性を持たない。Inoue らによる研究で、C および D 型の L-PTC は HA 活性を持つと報告されており、シアル酸の 1 種である *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) を介して血球に結合することを示した (Inoue, K., et al., 1999)。一方、Oguma らによる研究では、D 型菌 1873 株 (D-1873) の培養上清は HA 活性をほとんど持たないと報告されている (Oguma, K., et al., 1976)。同様に、Nakajima らは、D-1873 の培養上清から精製された L-PTC は他の D 型 L-PTC と比較して HA 活性が著しく低いことを報告している (Nakajima, H., et al., 1998)。Matsuo らもまた、北海道余市町で飼育されていたミンクの大量死の際に分離された C 型菌 Yoichi 株 (C-Yoichi) が産生する L-PTC は他の C 型 L-PTC と比較して、HA 活性が顕著に低いことを報告している (Matsuo, T., et al., 2011) (伊藤武., 1976)。Sagane らは、C-Yoichi および D-1873 の L-PTC の構成成分である HA-33 の C 末端アミノ酸配列分析の結果から、C-Yoichi および D-1873 の L-PTC は翻訳後に HA-33 の C 末端側 31 残基が欠損していることを見出した (Sagane, Y., et al., 2001)。このことから、C-Yoichi L-PTC による血球への凝集および結合の欠如は、HA-33 タンパク質の C 末端側 31 アミノ酸残基の欠落によるものであると予測された。一方で、Sagane らによる研究では、C-Yoichi HA-33 をコードする遺伝子配列の解析から HA-33 の C 末端側の領域 140 アミノ酸残基中 76 残基の変異が見られた。C-Yoichi HA-33 は一次構造の C 末端ドメインにおいて、他の C 型菌および D 型菌 HA-33 と比べて 40.8% の相同性を示した (Sagane, Y., et al., 2001)。また、Matsuo らの研究では、

neuraminidase (NDase) 処理した血球に対して C-Yoichi L-PTC が高い HA 活性および結合活性を示すことが示唆された。さらに、血球に galactose (Gal) あるいは lactose (Lac) の存在下において完全に HA 活性および結合活性を阻害することが明らかにされた。このことから、C-Yoichi L-PTC が他の C 型 L-TC とは異なり、Gal を認識することが報告された (Matsuo, T., et al., 2011)。さらに、Matsuo らは、NDase 処理を行った IEC-6 への結合試験を行い、C-Yoichi L-PTC の結合についても NDase 濃度依存的に増加したことを報告している。また、C-Yoichi HA-33/HA-17 の結合量は、IEC-6 を NDase 処理することによって結合量が劇的に増加することを示した (Matsuo, T., et al., 2011)。以上の先行研究から、C-Yoichi 株由来の L-PTC は、他の C 型 L-PTC と比較し、特異的な細胞結合性を有することが明らかとなった。しかし、C-Yoichi HA-33 は、他の C 型 HA-33 タンパク質と比較し、遺伝子変異と翻訳後修飾の 2 つの要因による一次構造の変化が生じているため、これらと細胞結合との関連性が不明のままである。

## 7. 本論文の構成

以上述べてきたように、ボツリヌス菌、およびボツリヌス毒素タンパク質については、数多くの研究が行われてきた。そしてボツリヌス無毒タンパク質の構造と機能についても研究が行われてきており、その中でも医学方面や美容方面での有効性が期待されている。本研究は C-Yoichi L-PTC の構成成分である HA-33 の構造と機能性の特徴を明らかにした。第 1 章ではボツリヌス菌および毒素タンパク質の研究について述べ、第 2 章では組換え体 HA-33 の作製について述べた。第 3 章は組換え体 HA-33 が C 型菌培養上清成分で切断を受けるのかを試み、

第4章では C-Yoichi と C-Stockholm L-PTC の細胞結合性の差異について検討した。第5章では C-Yoichi および C-Stockholm L-PTC のマウス経口毒性について調べた。第6章ではそれぞれの章を総括し、第7章では結言を述べた。

## 第2章 組換え体 C-Yoichi HA-33 の作製

### 第1節 緒言

ボツリヌス毒素複合体 (PTC) とはボツリヌス菌によって産生される 750 kDa のタンパク質である。PTC は、BoNT および NTNHA、3 種の血球凝集素 (HA-70、HA-33 および HA-17) と結合した複合体である (大山徹., 2006)。

PTC を経口摂取した場合、無毒タンパク質は BoNT を酸やプロテアーゼから保護し、小腸からの吸収を促進する。PTC は上皮細胞表面の糖鎖を認識することで小腸からの取り込みが起こり、ボツリヌス症を引き起こす。この際、PTC の HA-33 が接着分子として機能する (Fujinaga, Y., et al., 1997) (大山徹., 2006)。

Sagane らは C-Yoichi が産生する PTC は、他の C 型 PTC と比較し、HA 活性を示さないことを報告している (Sagane, Y., et al., 2001)。また、Sagane らは C-Yoichi PTC の構成成分である HA-33 の C 末端アミノ酸配列を C 型菌 Stockholm 株 (C-St) HA-33 と比較し、C-Yoichi PTC は HA-33 の C 末端側 31 アミノ酸残基が欠落していることを明らかにした。さらに、C-Yoichi HA-33 の一次構造の C 末端領域において、他の C 型菌および D 型菌 HA-33 と比較し、40.8%の相同性を示した (Sagane, Y., et al., 2001)。

このことから C-Yoichi HA-33 は他の C 型菌が産生する HA-33 とは異なる構造であることが予測される。Nakamura らは C 型菌 HA-33 の糖結合性を組換え GST-HA1 (HA-33) を用いて研究し、Neu5Ac、N-acetylgalactosamine (GalNAc) および Gal によってムチンへの結合が阻害されることを示した。さらに、結晶構造解析により、糖結合部位が二つあることを明らかにした。Site 1 が Neu5Ac、GalNAc、Gal の糖に結合し、Site 2 が Gal のみに結合すること、さらに、Site 1 は

HA-33 の C 末端  $\beta$ -trefoil domain に位置することを示している (Nakamura, T., et al., 2008)。すなわち、C-Yoichi HA-33 の C 末端欠落が Site 1 の糖結合部位に影響し、Site 2 の糖結合部位が残っていることが予測される。本章では、C-Yoichi HA-33 遺伝子に Tag を付与し、C 末端 31 アミノ酸残基が欠落した HA-33 の組換え発現系を構築することを目的とした。さらに、可溶タンパク質としての HA-33 を得るため、数種の Tag や HA-17 タンパク質と複合体としての発現系の確立を目指した。

## 第2節 実験材料および方法

### 1. 供試菌株

タンパク質発現用大腸菌コンピテントセルとして Invitrogen 社の BL21 (DE3) Star 株を使用した。遺伝子クローニング用の大腸菌コンピテントセルとして Invitrogen 社の DH5 $\alpha$  株、および New England Biolabs 社の NEB10-beta 株を使用した。HA-33 のゲノム DNA 抽出のために北海道立衛生研究所より供与された *C. botulinum* C-Yoichi 株および C-St 株を使用した。

### 2. 供試試薬

培地作成にはナカライテスク株式会社の Trypticase peptone、Yeast extract、プラスミド DNA の精製にはタカラバイオ社 NucleoSpin Plasmid EasyPure を用いた。PCR には TOYOBO KOD FX を使用した。コロニーPCR にはニッポン・ジーン社の Gene Taq を使用した。サイクルシーケンスには、ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit、シーケンス解析には ABI 3130 を用いた。組換え体精製には Cytiva 社の HisTrap HP、StrepTrap HP を用いた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) に、Wako 社の Acrylamide-HG、N,N'-Methylene-bis- (acrylamide) -HG、Ammonium persulfate、N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine および Sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いた。

### 3. 供試培地

#### 3-1. Luria-Bertani (LB) 培地

大腸菌を培養するために LB 培地を使用した。1% Trypticase Peptone、1% NaCl および 0.5% Yeast Extract を含む培養液を、NaOH を用いて pH 7.0 に調整したものを試験管に 10 mL ずつ分注し、121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌した。

#### 3-2. Terrific broth (TB) 培地

大腸菌を培養するために TB 培地を使用した。1.2% Tryptone、2.4% Yeast Extract および 0.5% Glycerol を含む培養液 900 mL に 0.17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  を含む 10× TB salts 100 mL を合わせ、121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌した。

#### 3-3. LB 寒天培地

形質転換体のスクリーニングには LB 寒天培地を使用した。1% Trypticase Peptone、1% Yeast Extract および 1% NaCl になるように超純水で溶解したものを 1 N の NaOH で pH 7.0 に調整後、1% になるように Bacto Agar を加え、121°C、20 分間オートクレーブ滅菌をした。

#### 4. 組換えタンパク質の作製

##### 4-1. 組換え C-Yoichi HA-33 プラスミドの精製

先に Hayashi らによって作製された C-Yoichi HA-33 遺伝子を含むプラスミド (pET200/D-TOPO-*ha-33*) が導入された大腸菌 BL21 株からプラスミドの抽出を行った (Hayashi, S., et al., 2014)。菌体を、100 µg/mL Kanamycin を含む 10 mL の LB 培地で 200 rpm、37°C で 24 時間振盪培養し、NucleoSpin Plasmid EasyPure のマニュアルに従いプラスミド DNA の精製を行った。

##### 4-2. HA-33 遺伝子への stop codon の導入

プラスミドに導入した C-Yoichi HA-33 遺伝子 (pET200/D-TOPO-*ha-33*) に stop codon を導入するため L18、L19 プライマー (Table 1) および TOYOBO KOD FX を用い、PCR を行った。反応液は、2× KOD FX buffer 25 µL、プライマー (100 pM) 0.5 µL、2.5 mM dNTPs 10 µL、プラスミド DNA (2.5 ng/µL) 14 µL、TOYOBO KOD FX 0.5 µL を混合し、滅菌超純水を加えて全量を 50 µL にした。反応条件は、Pre-heat (94°C、2 分)、Denaturation (98°C、10 秒)、Annealing (55°C、30 秒)、Extension (68°C、1 分) のサイクルを 32 回繰り返し、Final extension (68°C、30 秒) とした。増幅した DNA は、SMOBIO 社 Fluoro Vue 核酸染色試薬を含む 2% アガロースゲルにて電気泳動によって分離し、Safe Imager により DNA バンドを検出した。得られた組換え遺伝子を vHA-33 とした。



#### 4-3. HA-33 遺伝子への dual-tag (HA-tag および FLAG-tag) の導入

プラスミドに導入した C-Yoichi HA-33 遺伝子 (pET200/D-TOPO-*ha-33*) に HA-tag および FLAG tag を導入するため、L31 および L32 プライマー (Table 1) および TOYOBO KOD FX を用いて PCR を行った。反応液は、2×KOD FX buffer 25  $\mu$ L、プライマー (100 pM) 0.5  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 10  $\mu$ L、プラスミド DNA (99.5  $\mu$ g/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L、TOYOBO KOD FX 0.5  $\mu$ L を混合し、滅菌超純水を加えて全量を 50  $\mu$ L にした。反応条件は、Pre-heat (94°C、2 分)、Denaturation (98°C、10 秒)、Annealing (56°C、30 秒)、Extension (68°C、1 分) のサイクルを 32 回繰り返し、Final extension (68°C、30 秒) とした。増幅した DNA は、SMOBIO 社 Fluoro Vue 核酸染色試薬を含む 2% アガロースゲルにて電気泳動によって分離し、Safe Imager により DNA バンドを検出した。得られた組換え遺伝子を dual-tag HA-33 とした。

#### 4-4. vHA-33 および dual-tag HA-33 のプラスミドベクターへの導入

vHA-33 および dual-tag HA-33 をプラスミドベクター (pET28a) に組み込むためそれぞれの PCR 産物を制限酵素処理した。すなわち、vHA-33 と pET28a をそれぞれ Cutsmart 6  $\mu$ L、NdeI 0.5  $\mu$ L、XhoI 0.5  $\mu$ L および滅菌超純水 3  $\mu$ L と混合した。一方、dual-tag HA-33 と pET28a をそれぞれ、Cutsmart 3  $\mu$ L、BamHI 0.5  $\mu$ L、XhoI 0.5  $\mu$ L および滅菌超純水 3  $\mu$ L と混合した。それぞれの反応液を 37°C、overnight で静置した。DNA の切断は、アガロースゲル電気泳動で確認した。切断後の DNA 断片は、切断部位同士をライゲーションにて結合させるために PCR

産物 3  $\mu$ L、pET28a 3  $\mu$ L、NEB T4 Ligase 0.5  $\mu$ L、NEB 5 $\times$  T4 buffer 2  $\mu$ L を混合し、滅菌超純水を加えて全量を 9  $\mu$ L にし、室温で 1 時間静置した。

#### 4-5. HA-tag を導入した HA-33 遺伝子の作製

dual-tag HA-33 遺伝子を鋳型とし、L36 および L37 プライマー (Table 1) を用いて HA-33 の上流に HA-tag を有する遺伝子の作製を PCR によって行った。すなわち、2 $\times$  KOD FX Buffer 25  $\mu$ L、プライマー 各 0.5  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 10  $\mu$ L、dual-tag HA-33 プラスミド (2.5 ng/ $\mu$ L) 14  $\mu$ L、TOYOBO KOD FX 0.5  $\mu$ L を混合し、滅菌超純水を加えて全量を 50  $\mu$ L にした。反応条件は、Pre-heat (94 $^{\circ}$ C、2 分)、Denaturation (98 $^{\circ}$ C、10 秒)、Annealing (60 $^{\circ}$ C、30 秒)、Extension (68 $^{\circ}$ C、1 分) のサイクルを 32 回繰り返す、Final extension (68 $^{\circ}$ C、30 秒) とした。得られた DNA 断片を HA-HA-33 とした。

#### 4-6. Strep-tag を導入した HA-17 遺伝子の作製

N 末端側に Strep-tag を導入した HA-17 遺伝子の増幅を行うため、C-Yoichi ゲノム DNA と L38 および L39 プライマー (Table 1) を用いた PCR を行った。すなわち、TOYOBO KOD FX Buffer 25  $\mu$ L、プライマー 各 0.5  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 10  $\mu$ L、C-Yoichi ゲノム DNA (2.5 ng/ $\mu$ L) 14  $\mu$ L、TOYOBO KOD FX 0.5  $\mu$ L を混合し、滅菌超純水を加えて全量を 50  $\mu$ L にした。反応条件は、Pre-heat (94 $^{\circ}$ C、2 分)、Denaturation (98 $^{\circ}$ C、10 秒)、Annealing (55 $^{\circ}$ C、30 秒)、Extension (68 $^{\circ}$ C、1 分) のサイクルを 32 回繰り返す、Final extension (68 $^{\circ}$ C、30 秒) とした。得られた断片を Strep-HA-17 とした。

#### 4-7. pETduet1 plasmid への HA-HA-33 および Strep-HA-17 遺伝子の導入

2 つのマルチプルクローニングサイト (MCS) をもつ pETduet1 plasmid に HA-HA-33 および Strep-HA-17 遺伝子をそれぞれ導入した。すなわち、pETduet1 plasmid 50  $\mu$ L を制限酵素 NdeI および XhoI 0.5  $\mu$ L ずつ、滅菌超純水 3  $\mu$ L、Cutsmart 6  $\mu$ L と混合し、37°C、overnight で静置した。その後、Strep-HA-17 遺伝子 0.5  $\mu$ L、pETduet1 plasmid 2  $\mu$ L、Gibson Assembly master mix 2.5  $\mu$ L を混合して 50°C、1 時間インキュベートした。目的の遺伝子が導入されたプラスミドを pETduet HA-17 とした。さらに、pETduet HA-17 50  $\mu$ L を制限酵素 NcoI および NotI 0.5  $\mu$ L ずつ、滅菌超純水 3  $\mu$ L、Cutsmart 6  $\mu$ L と混合し、37°C、overnight で静置した。得られた溶液のうち 2  $\mu$ L を HA-HA-33 1  $\mu$ L、2×Gibson Assembly master mix 3  $\mu$ L を混合し 68°C、6 分インキュベートした。得られた DNA 断片 (pETduet1 HA-33/HA-17) は、コンピテントセル BL21 に形質転換した。

#### 4-8. vHA-33 への MBP-tag の導入

MBP-tag を導入した vHA-33 の DNA を増幅させるために KOD FX polymerase (TOYOBO) を用いプロトコルに従って PCR を行った。反応液および反応時間はプロトコルに従った。プライマーは L234 および L235 (Table 1) を使用し、鋳型として C-Yoichi ゲノム DNA を用いた。SMOBIO 社 Fluoro Vue 核酸染色試薬を含む 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、Safe imager により DNA バンドを検出した。PCR により増幅された PCR 産物を pMAL-c6T に組み込むために、NotI、BamHI (各 20,000 U/mL) を用いて制限酵素処理を行った。pMAL-c6T は 0.8% アガロースゲルにて電気泳動を行った。そして、切断部位同士をラ

ライゲーションにて結合させるために、T4 DNA Ligase を用いた。反応液および反応条件はプロトコルに従った。

#### 4-9. C-St HA-33 発現ベクターの構築

C-St HA-33 の DNA を増幅させるために、KOD FX polymerase (TOYOBO) を用いプロトコルに従って PCR を行った。反応液の調製および反応時間はプロトコルに従った。プライマーは L18 および L35 (Table 1) を使用し、鋳型として C-St ゲノム DNA を用いた。SMOBIO 社 Fluoro Vue 核酸染色試薬を含む 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、Safe imager により DNA バンドを検出した。PCR により増幅された PCR 産物を pET28a に組み込むために NdeI、XhoI (各 20,000 U/mL) を用いて制限酵素処理を行った。反応液はプロトコルに従い、37°C、一晩放置した。PCR 産物は SMOBIO 社 Fluoro Vue 核酸染色試薬を含む 2% アガロースゲル、pET28a は 1% アガロースゲル電気泳動を行い、Safe imager により DNA バンドを検出した。そして、切断部位同士をライゲーションにて結合させるために、T4 DNA Ligase を用いた。反応液および反応条件はプロトコルに従った。

#### 5. 形質転換

ライゲーション後の反応液を DH5 $\alpha$  30  $\mu$ L へ、エレクトロポレーションによって形質転換した。それぞれのセルは、LB 培地 1 mL で 1 時間回復培養し、10,000 rpm、1 分間の遠心分離後、上清を捨て 200  $\mu$ L 程度の上清で沈殿を懸濁、100

$\mu\text{g/mL}$  Kanamycin を含む LB 寒天培地を用いてスクリーニングを行った。その後、コロニーPCR により目的の遺伝子が導入された菌をさらにスクリーニングした。

## 6. コロニーPCR

目的の遺伝子が導入された菌体をスクリーニングするため、PCR に用いたプライマーセットを用いてコロニーPCR を行った。10× Gene Taq Universal Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、2.5 mM dNTPs Mix 4  $\mu\text{L}$ 、Taq Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$ 、プライマー各 0.5  $\mu\text{L}$ 、滅菌超純水 38.5  $\mu\text{L}$  を混合し、全量を 50  $\mu\text{L}$  の Master mix を作製し、10  $\mu\text{L}$  ずつ分注、採取したコロニーを分注した溶液に混入させた。反応条件は、Pre-heat (94°C、5 分) の後、Denaturation (94°C、30 秒)、Annealing (60°C、30 秒)、Extension (72°C、1 分) のサイクルを 35 回繰り返す、Final extension (72°C、5 分) とした。増幅した DNA は、SMOBIO 社 Fluoro Vue 核酸染色試薬を含む 1% アガロースゲルにて電気泳動によって分離し、Safe Imager により DNA バンドを検出した。

## 7. プラスミド精製およびシーケンス解析

コロニーPCR でバンドの確認ができたコロニーの塩基配列を確認するために、シーケンス解析を行った。サイクルシーケンスには ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用した。シーケンス解析には ABI 3130 を用いた。まず、コロニーを 100  $\mu\text{g/mL}$  Kanamycin を含む 10 mL LB 培地で 200 rpm、37 °C で一晩振盪培養し、NucleoSpin Plasmid EasyPure のマニュアルに従いプラスミド DNA の精製を行った。その後、プラスミド DNA 1  $\mu\text{L}$ 、プライマー (表 1: 100

pM) 0.5  $\mu$ L、Big dye 1  $\mu$ L、Sequence buffer 2  $\mu$ L、滅菌超純水 5.5  $\mu$ L を混合し全量を 10  $\mu$ L とした。反応条件は Pre-heat (96°C、1 分) の後、Denaturation (96°C、10 秒)、Annealing (50°C、5 秒)、Extension (60°C、4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。なお、プライマーはそれぞれの PCR に用いた forward および reverse プライマーをそれぞれ用いた。得られた産物は、エタノール沈殿によって精製した。反応後の DNA 溶液 10  $\mu$ L に 3 M 酢酸ナトリウム 1  $\mu$ L、100% エタノール 25  $\mu$ L の順で試薬を加えて混合し、室温で 10 分程度静置した。その後、遠心分離 (15,000 rpm、15 min) によって、DNA を回収した。回収した DNA は、70% エタノールで 2 回洗浄した。得られた沈殿を 30 分間、室温で乾燥させ、Hi-Di 15  $\mu$ L で沈殿を溶解し、95°C で加熱、加熱後すぐに冷却して DNA シーケンサーで塩基配列を解析した。

#### 8. 発現用大腸菌への形質転換

シーケンス解析で目的の塩基配列を確認できたプラスミドを、コンピテントセル BL21 に形質転換した。すなわちプラスミド 1  $\mu$ L をヒートショックにて Invitrogen BL21 30  $\mu$ L へ形質転換導入し、LB 培地 1 mL で 30 分、30°C で回復培養し、10,000 rpm、1 分遠心、上清を捨て 200  $\mu$ L 程度の残った上清で沈殿を懸濁、100  $\mu$ g/mL Kanamycin を含む LB 寒天培地を用いてスクリーニングを行った。

## 9. 組換えタンパク質の調製

形質転換体を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin を含む 10 mL LB 培地で 200 rpm、37°C で一晩振盪培養した。2,000 mL 用 Baffle 型三角フラスコに TB 培地を 1,000 mL を入れ、予備培養した培養液を加え 200 rpm、37°C で O.D<sub>660</sub> が約 0.5 に達するまで振盪培養した。Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度が 0.4 mM になるように添加し、18°C、18 時間振盪した。また、この際に IPTG を添加していない IPTG<sup>-</sup> (1 mL) を作製、遠心分離 (10,000 rpm、1 min) し、-20°C で凍結した。振盪培養後、培養液を 1 mL 採取、これを IPTG<sup>+</sup>として IPTG<sup>-</sup>と同様に回収し、-20°Cで凍結した。菌体を室温で融解し、0.3 M NaCl を含む 50 mM Phosphate buffer (pH 7.5) + 0.02 M Imidazole を 50 mL 程度加え懸濁し、超音波破碎を行った。破碎液を遠心分離 (12,000 rpm、30 min、4°C) し、上清を可溶性画分とした。タンパク質の精製は、アフィニティーカラムクロマトグラフィーで行った。すなわち、あらかじめ 0.3 M NaCl を含む 50 mM Phosphate buffer (pH 7.5) + 0.02 M Imidazole で平衡化された His-trap あるいは Strep-trap カラムに負荷し、吸着したタンパク質を 0.3 M Imidazole + 10% Glycerol を含む平衡化 buffer により溶出させた。

## 10. MBP-tag vHA-33 の精製

MBP-tag vHA-33 を導入した菌体を室温で融解し、20 mM Tris buffer (pH 7.5) + 200 mM NaCl + 1 mM EDTA を 30 ml 程度と 0.1 M PMSF 300  $\mu\text{L}$  を加え懸濁し、超音波破碎を行った。破碎液を遠心分離 (10,000 rpm、20 min、4°C) し、上清を可溶性画分とした。Amylose Resin (NEB) に負荷し、20 mM Tris HCl (pH7.5)

+200 mM NaCl+1 mM EDTA+10 mM maltose により溶出した。各溶出画分を SDS-PAGE 分析し、vHA-33 に相当する画分を回収し、Amicon Ultra (Merck) で濃縮した。MBP-tag を切断するために、450  $\mu$ L のサンプルに 10 $\times$ TEV Protease Reaction Buffer 50  $\mu$ L と TEV Protease 1  $\mu$ L を加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。30 $^{\circ}$ C、2 時間静置した後、SDS-PAGE に負荷し切断を確認した。

## 11. SDS-PAGE

SDS-PAGE は、Laemmli (Laemmli, U. K., 1970) の方法に従った。13.6% のポリアクリルアミド分離ゲルと、4.5% 濃縮用ゲルによって構成されたゲルを用いて電気泳動を行った。各試料に 3% 2-Mercaptoethanol、3% SDS および 60% Glycerin を含む 30 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) を加えて混合し、5 分間煮沸した後 SDS-PAGE の試料とした。先行マーカーとして 0.05% Bromophenol blue (BPB) を含む 60% glycerol 溶液を各サンプル孔に 2  $\mu$ L ずつ注入し、分子量マーカー (Amersham LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis, GE Healthcare) および試料をサンプル孔に注入した。泳動は濃縮ゲル 150 V、分離ゲル 180 V の定電流で行った。泳動後のゲル上のタンパク質は 0.25% CBB 染色液によって検出した。また、vHA-33 のみウエスタンブロットを行うため、分子量マーカーは DynaMarker Protein MultiColor III (フナコシ株式会社) を使用した。



## 12. ウェスタンブロッティング

Nitrocellulose 膜 (Amersham Hybond -ECL, GE Healthcare) 1 枚と、濾紙 (#1620262; Bio-Rad laboratories) を 2 枚使用した。電気泳動のゲルを semidry buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol, 0.38 g/L SDS) を用いてセミドライ式ブロッティング装置 (BE-351w, Bio Craft) で Nitrocellulose 膜へ 20 V の低電圧で 25 分間エレクトロブロットした。その後、Nitrocellulose 膜を取り出し、5% Skim milk を含む TBST (5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 13.8 mM NaCl, 0.27 mM KCl, and 0.05% Tween 20) により 1 時間室温でブロッキングした後、TBST で Nitrocellulose 膜を洗浄 (10 分 × 3 回) し、一次抗体として 5% Skim milk を含む TBST で 1,000 倍希釈した Rabbit Anti-HA-33 に浸し、1 時間室温で振盪した。TBST で Nitrocellulose 膜を洗浄 (10 分×3 回) し、二次抗体として 5% Skim milk を含む TBST で 1,000 倍希釈した Goat Anti-rabbit IgG-HRP に Nitrocellulose 膜を浸し、1 時間室温で振盪した。再び TBST で洗浄 (10 分×3 回) し、Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いてバンドを化学発光させた。化学発光を Light-Capture II (AE-6981/2 型 C/FC、ATTO) を用いて検出した。

### 第3節 実験結果

#### 1. vHA-33 の導入、形質転換およびシーケンス解析

C-Yoichi が産生する HA33 は翻訳後に C 末端 31 アミノ酸残基が欠落することが示されている。C-Yoichi 培養上清から C 末端 31 アミノ酸残基が欠落した HA-33 の分離・精製することは困難であるため、本研究では C 末端 31 アミノ酸残基が欠落した HA-33 (vHA-33) の作製を試みた。C-Yoichi HA-33 の C 末端側 31 アミノ酸残基を欠落させるために、vHA-33 の Plasmid DNA に Stop コドンを導入する Primer を設計し、PCR を行なった。PCR 産物を DH5 $\alpha$  株に形質転換後、LB 寒天培地でスクリーニングを行ない Gene Taq を使用し、コロニーPCR を行なった。結果、予測されるバンドサイズである 748 bp 付近にバンドが表れたため形質転換が行われていることが確認できた (Fig.1)。コロニーの塩基配列を確認するために、Plasmid 精製をし、シーケンス解析を行なった。

#### 2. vHA-33 の培養および精製

塩基配列を確認したコロニーを採取し、LB 培地にて Pre 培養した。本培養を行い、菌体を回収、超音波破碎し、affinity chromatography に負荷し、溶出した。溶出画分、超音波破碎後の沈殿物を SDS-PAGE で泳動し、HA-33 抗体を用いたウエスタンブロットでバンドの検出を行なった。結果、溶出画分よりも、沈殿物のバンドが強く検出され、C 末端欠落 HA-33 が封入体となっていることが示唆された (Fig.1)。

### 3. HA-HA-33-FLAG (dual-tag HA-33) の導入、形質転換およびシーケンス解析

Trypsin 処理による HA-33 の切断部位の同定を行うために、N 末端側に HA Tag、C 末端側に FLAG Tag を付与した HA-HA-33-FLAG の作製を行なった。FLAG Tag を C 末端側に付加した C-Yoichi HA-33 を、HA-Tag が組み込まれている Plasmid に導入した。その後、DH5 $\alpha$  に形質転換し、LB 培地でスクリーニングを行なった。コロニーPCR を行なった結果、予測されるバンドサイズである 905bp 付近にバンドが確認できた (Fig.2)。コロニーの塩基配列を確認するため、Plasmid を精製し、シーケンス解析を行なった。

### 4. HA-HA-33-FLAG (dual-tag HA-33) の培養および精製

塩基配列を確認したコロニーを採取し、LB 培地にて Pre 培養した。本培養を行い、IPTG 添加前、添加後の大腸菌を回収し、SDS-PAGE でタンパク質の発現を確認した。その後、回収した菌体を His Trap HP に負荷し、溶出画分を作成、溶出画分を SDS 処理液で変性させ、SDS-PAGE に負荷し、精製を行なった。結果、37.6 kDa 付近にバンドが確認された (Fig.2)。

### 5. HA-33/HA-17 の導入、形質転換およびシーケンス解析

C-Yoichi から産生される HA-33 は HA-17 が結合した、HA-33/HA-17 複合体として培養液中に存在することが確認されている (Sagane, Y., et al., 2017)。HA-33/HA-17 は N 末端側に HA-17 が結合しており、Trypsin により N 末端側の切断が受けにくい (Suzuki, T., et al., 2005)。本研究では、HA-33 の N 末端側の欠落が HA-17 によって阻害されるのかを解明することを目的とし、大腸菌を用いた HA-33/HA-17 複合体の大量培養発現系の構築を行なった。C-Yoichi genome を鋳

型とし、HA-17 遺伝子を PCR で増幅し、pET duet1 Plasmid (MCS2) に導入した。DH5 $\alpha$  株に形質転換後、LB 寒天培地でスクリーニングを行なった。コロニーPCR を行なった結果、予測されるバンドサイズである 504bp 付近にバンドが確認できた (Fig.3)。Plasmid 精製し、シーケンス解析を行なった。HA-HA-33-FLAG を Gibson assembly を用いて Plasmid の MCS1 に導入した。コロニーPCR の結果、予測されるバンドサイズである 1021 bp 付近にバンドを検出した。形質転換、Gibson assembly が行われていることが確認された (Fig.3)。

#### 6. HA-33/HA-17 の培養および精製

塩基配列を確認したコロニーを採取し、LB 培地にて Pre 培養した。本培養を行い、菌体を回収、超音波破碎し、遠心後の上清を His Trap HP、Strep Trap HP に負荷し溶出画分を得た。溶出画分を SDS 処理液で変性させ SDS-PAGE に負荷、精製の確認を行なった。結果、37.8 kDa 付近と 17.8 kDa 付近にバンドを検出した。pET duet1 HA-33/HA-17 複合体が精製されていることが確認された (Fig.3)。

#### 7. MBP-tag vHA-33 の作製および精製

vHA-33 はタンパク質発現の際に封入体を形成することが確認された。そのため vHA-33 の N 末端側にマルトース結合タンパクである MBP-Tag を付与し (Fox, J. D., & Waugh, D. S., 2003)、可溶化を試みた。IPTG 添加前後でタンパク質の発現を比較したところ、IPTG 添加後に約 70 kDa 付近に強くバンドが出ていたため、発現を確認した (Fig.4)。Amylose Resin にて精製したところ、約 70 kDa 付近にバンドが確認された (Fig.5)。vHA-33 に相当する画分を回収し、TEV

Proteaseにて TEV site を切断し、SDS-PAGE に負荷したところ、約 30 kDa に vHA-33 単体の分子量のバンドを確認した (Fig.6)。

#### 第4節 考察

PTCは経口摂取された時、胃での消化をまぬがれ小腸に到達し、体内に吸収される。PTCの構成成分であるHA-33はPTCの腸管上皮への結合量を増加させる重要な働きがある。本研究では、C型菌Yoichi株の構造と機能を解明することを目的に、組換え体C-Yoichi HA-33の構築を行なった。

ウエスタンブロットの結果においてvHA-33は溶出画分と比べ、超音波破碎後の沈殿側にバンドが強く検出された。この結果からvHA-33はタンパク質発現の際に封入体を形成していることが確認された。この理由としてHA-33のC末端31アミノ酸残基は $\beta$ シートの形成に重要な部分であり、タンパク質のフォールディング時に凝集してしまうことが考えられる。このことから、タンパク質変性剤であるグアニジンや尿素を使用して封入体からvHA-33をリフォールディングして精製する必要があると考えられた。PTCの最も外側に位置するHA-33は経口摂取時に消化管内のプロテアーゼから切断を受けることが予想される(Hasegawa, K., et al., 2007)。しかし、プロテアーゼによるHA-33の切断はN末端、C末端のどちら側かは不明のままである。本研究では、Trypsin処理によるHA-33の切断部位の同定を行うために、N末端側にHA Tag、C末端側にFLAG Tagを付与したdual-tag HA-33の作製を行なった。大腸菌によるdual-tag HA-33の大量培養発現系の構築を行い、高純度なdual-tag HA-33タンパク質の精製法を確立した。C-Yoichiから産生されるHA-33はHA-17が結合した、HA-33/HA-17複合体になっており、HA-33/HA-17はN末端側にHA-17が結合しているため、TrypsinによりN末端側の切断が受けにくいことが考えられる。本研究では、HA-33のN末端側の欠落がHA-17によって阻害されるのかを解明することを目

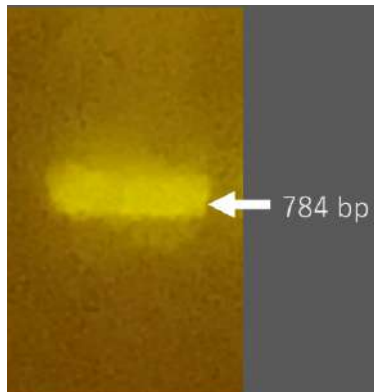
的とし、大腸菌を用いた HA-33/HA-17 複合体の大量培養発現系の構築を行なった。その結果、高純度な HA-33/HA-17 複合体タンパク質が精製され、精製法を確立することに成功した。次に vHA-33 の機能を調べるために、vHA-33 の作製を試みた。しかし、vHA-33 は封入体となり、精製が困難であった。そこで我々は、可溶化を促すために、vHA-33 の N 末端に MBP-Tag を付与した。結果は、MBP-Tag 付与による vHA-33 の可溶化に成功した。vHA-33 を TEV-Protease により MBP-Tag の分離を試みた。しかし、わずかに分離できていたが、TEV の切断能力が低く、vHA-33 のみの精製は困難であった。今後、C-Yoichi HA-33 の組換え体発現によって、構造と機能がさらに確かめられるであろう。

## 第5節 要約

本章では、様々な組換え体 C-Yoichi HA-33 の構築を目的とした。はじめに、C 末端 31 アミノ酸残基が欠落した vHA-33 の作製を試みた。しかし、ウエスタンブロットの結果、超音波破碎後の大腸菌沈殿物に組換え体 vHA-33 のバンドが検出されたため、封入体を形成していることが確認できた。そこで、vHA-33 の可溶化を試みるために、可溶化を促す MBP-tag を vHA-33 の N 末端側に付与し、MBP-tag vHA-33 の作製を試みた。SDS-PAGE でタンパク質の確認を行ったところ、66 kDa 付近にバンドが確認できたため可溶化に成功した。次に、プロテアーゼによる HA-33 の欠落は N 末端側、C 末端側どちら側から欠落するのか不明である。そのため、N 末端、C 末端の両端に Tag を付与した dual-tag HA-33 の発現系の構築を行なった。その結果、高純度な dual-tag HA-33 タンパク質の精製法を確立した。次に、C-Yoichi から産生される HA-33 は N 末端側に HA-17 が結合していると切断を受けにくいのかを確かめるために HA-33/HA-17 の作製を試みた。その結果、高純度な HA-33/HA-17 複合体タンパク質が精製され、精製法を確立することに成功した。



**A**



**B**



Fig.1 vHA-33 のコロニーPCR および vHA-33 の発現

A. 1% アガロースゲルに vHA-33 のコロニーPCR を附加し、784 bp 付近にバンドを確認した。

B. vHA-33 溶出画分および vHA-33 菌体をウエスタンブロットし Anti-PTC 抗体で検出した。溶出画分では HA-33 が検出されなかった。菌体ではバンドが濃く検出できた。

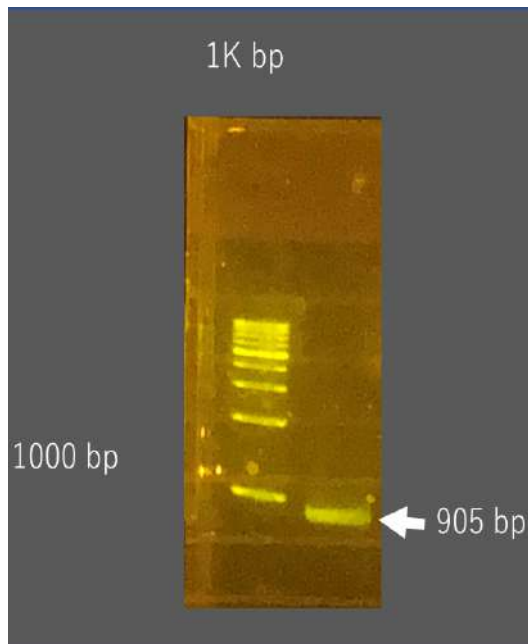
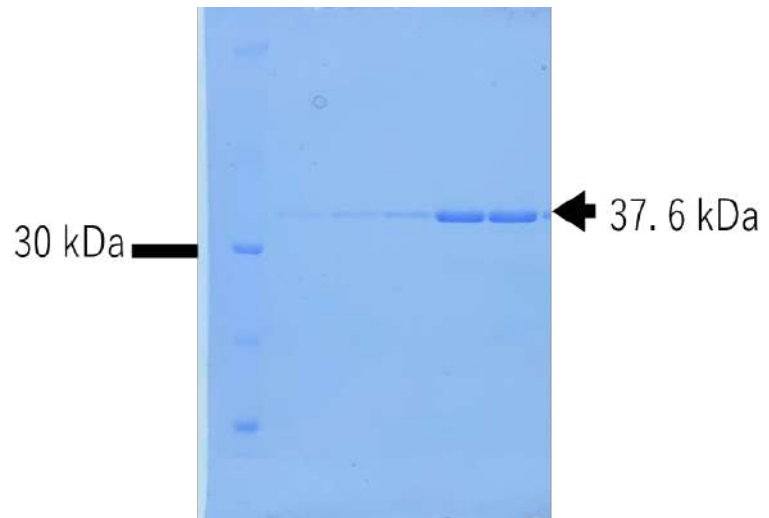
**A****B**

Fig.2 dual-tag HA-33 のコロニーPCR およびタンパク質精製

A. 1% アガロースゲルに dual-tag HA-33 のコロニーPCR を附加し、905 bp 付近にバンドを確認した。

B. 13.6% SDS ゲルに dual-tag HA-33 の可溶画分に附加し、37.6 kDa 付近にバンドを確認した。

pETduet1 HA-33/HA-17

pETduet1 HA-17

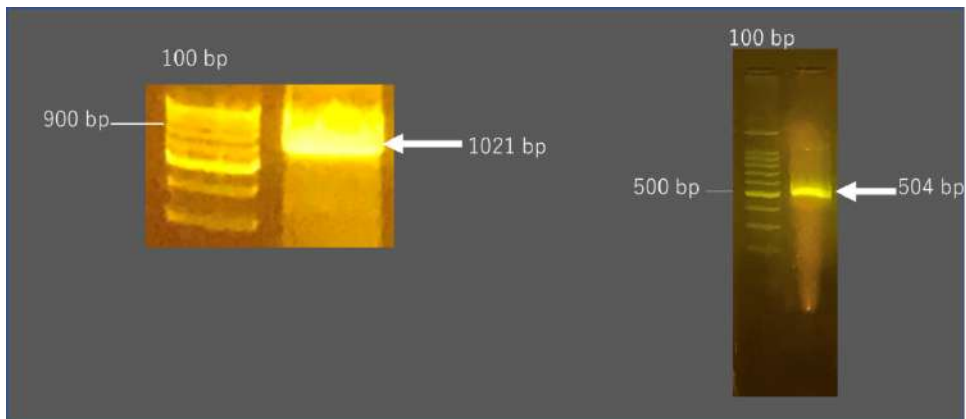


Fig.3 pETduet1 HA-33、pETduet1 HA-17 のコロニーPCR

1% アガロースゲルに pETduet1 HA-33/HA-17 pETduet1 HA-17 のコロニー PCR を附加し、1021 bp 504 bp 付近にバンドを確認した。

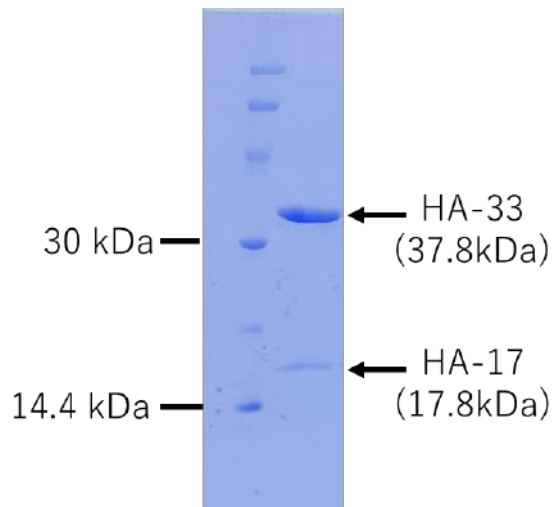


Fig.3-2 HA-33/HA-17 複合体のタンパク質精製

13.6% SDS ゲルに pETduet1 HA-33/HA-17 pETduet1 HA-17 の可溶画分を附加し、37.8 kDa 17.8 kDa 付近にバンドを確認した。

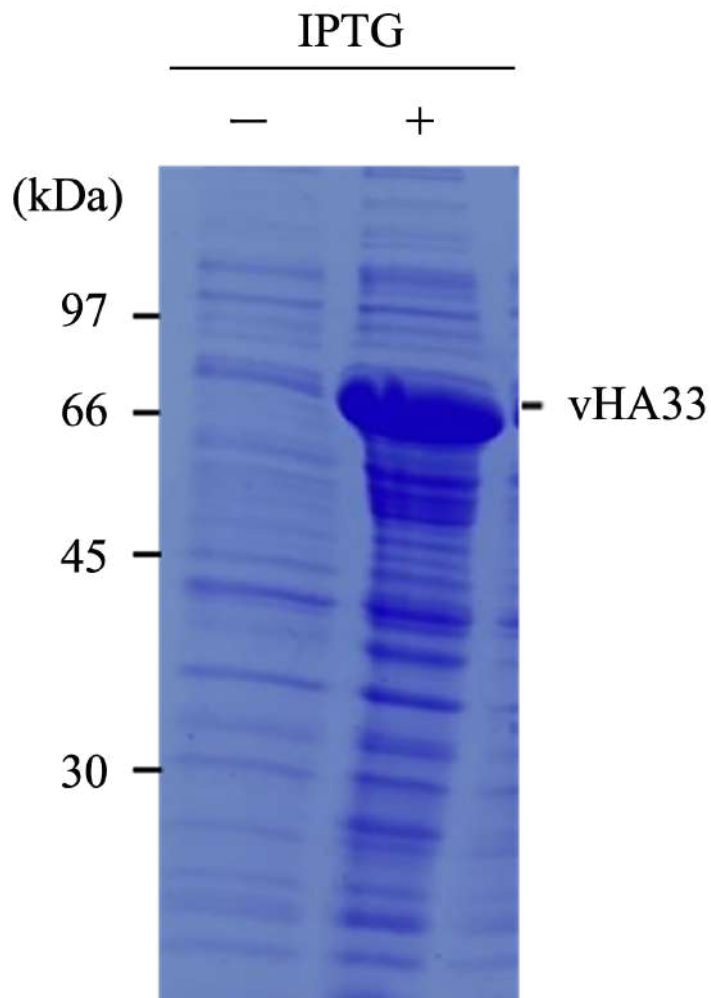


Fig.4 vHA-33 発現チェック

CBB 染色した SDS-PAGE で vHA-33 の発現を確認した。IPTG (-) が IPTG 添加なし。IPTG (+) が IPTG 添加あり。IPTG (+) では、約 70 kDa にバンド現れ、vHA-33 の発現を確認した。

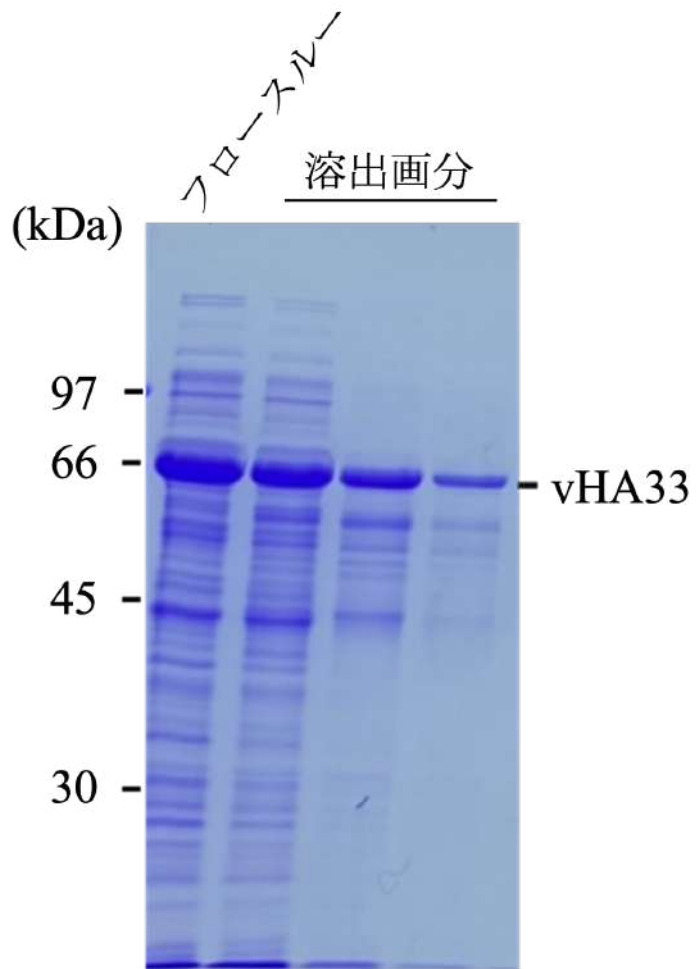


Fig.5 vHA-33 精製

CBB 染色した SDS-PAGE。vHA-33 の精製を確認した。フロースルー、溶出画分ともに vHA-33 の分子量である約 70 kDa にバンドを確認した。

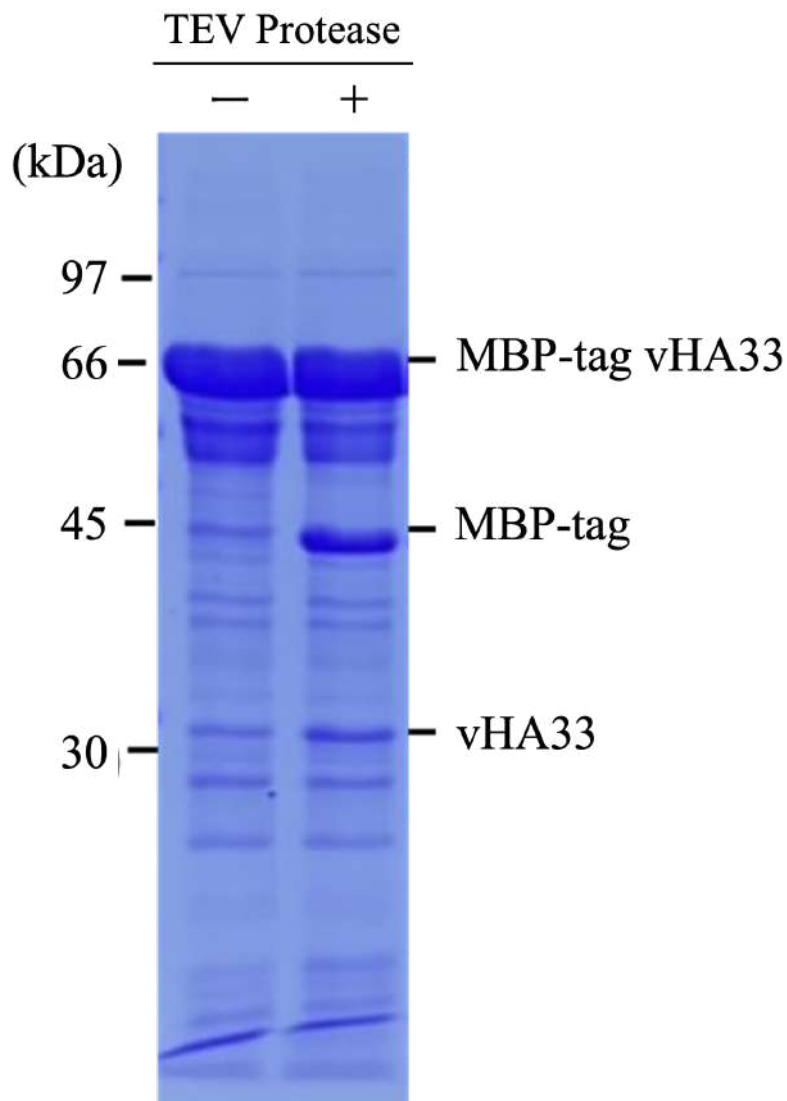


Fig.6 TEV Protease による vHA-33 の分離

CBB 染色した SDS-PAGE、TEV Protease による vHA-33 の分離を確認した。TEV Protease (-) が TEV Protease 添加なし。TEV Protease (+) が TEV Protease 添加あり。TEV Protease (+) では、MBP-tag (約 40 kDa) および vHA-33 (約 30 kDa) 付近にバンドを確認した。

Primer名	塩基配列
L18_F nHA-30 and rHA-33 for pET-28a	5'-GGAAATCCATATGtcaacaacaaatgcaaatg-3'
L19_R nHA-30 for pET-28a	5'-CCGCTCGAGttataaaaatttactttgattac-3'
L31_HA-Tag BamHI HA-33 F primer	5'-CGGGATCCATGtctcaacaacaaatgcaaatgatttaag-3'
L32_XhoI Flag-Tag HA-33 R primer	5'-CCGCTCGAGttaCTTGTCTGTCATCGTCTTTGTAGTCTGATCC'aatctgttataatcc-3'
L35_pET-28a C-St HA-33 R	5'-CCGCTCGAGttataataattataatccattgttg-3'
L36_Gibson His HA HA-33 Flag F	5'-GAAGGAGATATACCATGGGCCATCATCATCATCACAGCAGC-3'
L37_Gibson His HA HA-33 Flag R	5'-CTTAAGCATTATGCGGCCGCGtaCTTGTCTGTCATCGTCTTTGTAGTC-3'
L38_Gibson Strep HA-17 F	5'-GGAGATATACATATGtggagccaccgagttcgaaaaGGATCCA tgtcaagfgaaaacacctttttacc-3'
L39_Gibson Strep HA-17 R	5'-TTTACCA GACTCGAGttaaagtttttaaaatttgaatttataatc-3'
L234_F MBP NotI nHA30	5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCA TGtctcaacaacaaatg-3'
L235_R MBP BamHI nHA30	5'-CGCGGATCCttataaaaatttactttgattac-3'
C-Yoi-2	5'-CTATTTGGTTCATGGAAACAATGGA-3'
C-Yoi-3	5'-TCCATTGTTCCATGACCAAAATAG-3'
S1_T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
S7_DuetUP2 Primer	5'-TTGTACACGGCCGCATAATC-3'
S19_FWD_pMAL_Seq	5'-GAAGAGTTGGTGAAAGATCCCG-3'
S20_REV_pMAL_Seq	5'-GGACCGAAAGAGTTTGTAGAAACGC-3'

Table. 1 組換え体作製で使用了した Primer



### 第3章 組換え体 C-Yoichi HA-33 の切断試験

#### 第1節 緒言

ボツリヌス菌はグラム陽性偏性嫌気性の芽胞形成細菌であり、土壌や海底に存在する。嫌気性条件下になることで発芽、増殖を経て、毒素を産生する。

ボツリヌス菌は生物学的性状では、I~IVのグループに分けられ、I群はA、BおよびF型のうちタンパク質分解性の菌、II群はB、EおよびF型のうちタンパク質非分解性の菌が含まれる。一方、III群に分類されるCおよびD型菌は、そのタンパク質分解性に違いがあり、他の群に比べて生化学的性状が一定ではない。

IV群にはG型が分類されており、I群に比べ弱いタンパク質分解性を有している

(Hatheway, C. L., 1990) (Suzuki, T., et al 2009)。BoNTはボツリヌス菌由来のプロテアーゼにより、分子内切断が生じることが知られている (Suzuki, T., et al 2009)。HA-70はタンパク質分解により切断され、HA-22およびHA-50の2つ

に切断される (Oguma, K., et al., 1999) (Kouguchi, H., et al., 2001) (Fujinaga, Y., et al., 1994)。一般的なタンパク質は胃あるいは小腸で分解されるのに対し、

経口摂取されたBoNTはNTNHAにより保護され、その活性を保ったまま腸管に到達する。さらに、PTC構成成分であるHA-33は小腸上皮細胞の糖鎖への結合を増加させることでPTCの体内侵入を促進する (大山徹., 2006) (Fujinaga, Y., et al., 2000)。

A、B型のHA-33は糖認識部位が1つであり、Galを認識する (Inoue, K., et al., 2001) (金英姫., 2007)。C、D型のHA-33は糖認識部位が2つあり、

Site IがNeu5Ac、GalNAc、Gal、site IIがGalを認識する (Inoue, K., et al., 1999)

(Oguma, K., et al., 1999)。SaganeらはC-Yoichi培養上清中のHA-33はC末端側31アミノ酸残基が欠落 (variant HA-33: vHA-33) することを見出した (Sagane,

Y., et al., 2001)。また、C-Yoichi HA-33 をコードする遺伝子配列の解析から HA-33 の C 末端側 140 アミノ酸残基中 76 残基の変異がある事がわかっている。さらに C-Yoichi HA-33 は一次構造の C 末端ドメインにおいて、他の C 型および D 型 HA-33 と比べて 40.8%の相同性を示した (Sagane, Y., et al., 2001)。C-Yoichi の構成成分を C-St のアミノ酸配列と比較した研究では、BoNT、NTNHA、HA-70、HA-17 は約 100%の相同性を示し、HA-33 のみ 74%の相同性を示していた。また翻訳後修飾の入った vHA-33 は一般的な C 型 HA-33 とは異なり、Gal を認識することが示唆されている (Matsuo, T., et al., 2011) (Miyata, K., et al., 2015)。しかし、C-Yoichi vHA-33 の詳細な欠落メカニズムは明らかではない。本研究では C-Yoichi vHA-33 の欠落メカニズムと機能を明らかにすることを目的とした。

## 第2節 実験方法・材料

### 1. 供試菌株

供試菌株は北海道立衛生研究所より分与された *Clostridium botulinum* C 型菌 Yoichi 株 (C-Yoichi) および C 型菌 Stockholm 株 (C-St) を用いた。

### 2. 供試試薬および装置

供試試薬にはすべて特級を使用した。ボツリヌス菌培地作製の Ammonium Sulfate、D-(+)-glucose、L-cysteine hydrochloride monohydrate は Wako、Yeast Extract および Polypeptone は Life Technologies、Trypticase Peptone は BBL、Lactalbumin は Sigma-Aldorich、Peptone は極東製薬社、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用の Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)、Ammonium Persulfates、N, N, N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)、N, N'-methylene-bis(acrylamide)-HG (BIS)、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)、EDTA・2Na は Wako の製品を用いた。ウエスタンブロット用の Tween 20 は関東化学、Skim Milk Powder は Wako、Anti-rabbit IgG-HRP は Cell signaling technology の製品を用いた。ボツリヌス毒素精製の SP-Toyopearl 650 S 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは TOSOH 社、Mono S HR 5/50 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよび HiLoad 16/60 Superdex 200 pg は GE Healthcare Bio Sciences 社、High S (Bio-Rad laboratories)、HisTrap HP は Cytiva 社、Amylose Resin は、AE-6500 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽および AE-6401 ミニスラブゲル作製キットは ATTO 社、ミニプロテイン® Tetra セルおよびミ

ニプロティアン® Tetra セルキャスティングモジュールは BIO RAD、平板型転写装置セミドライタイプは日本エイダーの製品を用いた。

### 3. 供試培地

#### 3-1. 強化クックドミート培地 (FCM 培地)

1 % Ammonium Sulfate、1 % Yeast Extract および 1 % D-(+)-glucose を純水で溶解し、pH 7.0 に調整した。試験管に 1.25 g Cooked Meat Medium (Becton Dickson) を加え、調整した溶液を 10 mL ずつ分注し、オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分間) した。

#### 3-2. TYG 培地

3 % Trypticase Peptone、2 % Yeast Extract、0.5 % D-(+)-glucose および 0.1% L-cysteine hydrochloride monohydrate を含む 200 ml の液体培地を pH 7.4 に調整し、10 mL ずつ試験管に分注した後、オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分間) した。

#### 3-3. 透析培養培地

2% Polypeptone、2% Lactalbumin、1% Peptone および 1% Yeast Extract を含む pH 7.6 に調整した培養液 (透析培養外液) を 1.2 L 容試験管に 1 L 分注した。そこに 20% D-(+)-glucose、4% NaCl および 1% L-cysteine hydrochloride monohydrate を含む培養液 (透析培養内液) 50 mL を注入した 8×80 cm のセルロースチューブを挿入した後、オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分間) した。

## 4. SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング

### 4-1. SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (Laemmli, U. K., 1970) の方法に従った。13.6% ポリアクリルアミド分離ゲルと 4.5%ポリアクリルアミド濃縮ゲルにより構成されたゲルを用いた。分子量マーカーに Amersham TM LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis (GE Healthcare) を用いた。4×SDS 処理液である 25% 1 M Tris-HCl (pH 6.8)、8% SDS、30% glycerol、20% Coomassie Brilliant Blue を加え、100°C、5 分間加熱し、SDS-PAGE 試料とした。電気泳動は 150 V 濃縮ゲル、180 V 分離ゲルの定電流で行った。泳動後のゲル上のタンパク質は CBB 染色液によって検出した。

### 4-2. ウエスタンブロッティング

13.6% ポリアクリルアミド分離ゲルと 4.5%ポリアクリルアミド濃縮ゲルにより構成されたゲルを用いた。分子量マーカーに DynaMarker® Protein MultiColor Stable II を用いた。泳動は 120 V 濃縮ゲル、分離ゲルの定電流で行った。SDS-PAGE により分離後、Nitrocellulose 膜 (Amersham TM Hybond TM -ECL, GE Healthcare) および 6×9 cm の濾紙を用いた。電気泳動のゲルを Semi dry buffer (0.58% Tris、0.229% Glycine、0.038% SDS、20% Methanol) を用いてセミドライブロッティング装置で Nitrocellulose 膜へ 20 V の定電圧で 25 分間エレクトロブロットした。その後、Nitrocellulose 膜を取り出し、5% Skim milk を含む TBST (5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 13.8 mM NaCl, 0.27 mM KCl, and 0.05% Tween 20) をブロッキング液として、1 時間室温でブロッキングした。一次抗体 (抗 HA-33 抗

体)をブロッキング液で1000倍希釈した抗体に浸し、一晩4°Cで振盪した。TBSTでNitrocellulose膜を洗浄(10分×3回)し、二次抗体(Anti-rabbit IgG)をブロッキング液で5,000倍希釈した抗体にNitrocellulose膜を浸し、1時間室温で振盪した。再びTBSTで洗浄(10分×3回)し、Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)を用いてバンドを化学発光させた。化学発光をLight-Capture II (AE-6981/2型C/FC, ATTO)を用いて検出した。

## 5. ボツリヌス菌の培養およびボツリヌス毒素の精製

### 5-1. 透析培養法

ボツリヌス菌の培養法はSyutoとKuboの透析培養法に従った(Syuto, B., & Kubo, S., 1972)。強化クックドミート培地で培養した種菌を、白金耳を用いてTYG培地に植菌し、37°Cで一晩培養した。ボツリヌス菌が増殖した培養液約10 mLを透析培養培地の透析チューブに加え、37°Cで5日間インキュベートした。

### 5-2. C-Yoichi および C-St の PTC の精製

PTCの精製は、Mutohらの方法に従って行った(Mutoh, S., et al., 2005)。透析培養法で得られた透析培養液内液を集め、得られた透析培養液内液を遠心分離(10,000×G、25 min、4°C)し、菌体と培養上清に分離した。得られた培養液を60%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、4°Cで一晩静置した。遠心分離(10,000×G、25 min、4°C)後、沈殿をC-Yoichiは50 mM Acetate buffer (pH 4.0) および、C-Stockholmは0.2 M NaClを含む50 mM Acetate buffer (pH 4.0)で溶解し、同Bufferに対して一晩透析した。透析後、透析内液を遠心分離

(10,000×G、25 min、4°C) し、上清を粗毒素液とした。C-Yoichi および C-Stockholm 粗毒素液をそれぞれ 50 mM Acetate buffer (pH 4.0) もしくは 0.2 M を含む 50 mM Acetate buffer (pH 4.0) で平衡化した SP-Toyopearl 650 S 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに負荷した。陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに吸着した C-Yoichi および C-Stockholm 毒素をそれぞれ 0 M~0.6 M NaCl もしくは 0.2 M~0.8 M NaCl の直線濃度勾配により溶出した。各溶出画分を Native-PAGE および SDS-PAGE 分析し、PTC に相当する画分を集め、80%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え濃縮した。PTC 硫酸アンモニウム沈殿を 0.15 M NaCl を含む 50 mM Acetate buffer (pH 4.0) で溶解し、同 buffer で平衡化した HiLoad 16/60 Superdex 200pg ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに負荷し、溶出させた。各溶出画分を Native-PAGE および SDS-PAGE 分析し、PTC に相当する画分を集め、50 mM Acetate buffer (pH 4.0) で一晩透析した。透析後、透析内液を遠心分離 (10,000×G、20 min、4°C) し、遠心上清を同 buffer で平衡化した Mono S HR5/50 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに負荷し、0 M~1.0 M NaCl の直線濃度勾配により溶出した。各溶出画分を Native-PAGE および SDS-PAGE 分析し、PTC に相当する画分を集め、精製標品とした。

## 6. 組換え体 HA-33 とボツリヌス菌培養溶液の混合試験

### 6-1. ボツリヌス菌培養溶液による組換え体 HA-33 の切断試験

C-Yoichi HA-33 の C 末端切断要因を調べるために、Hayashi らが作製した組換え体全長型 HA-33 とボツリヌス菌培養溶液の混合を行った (Hayashi, S., et al., 2014)。強化クックドミート培地で培養した種菌を、白金耳を用いて TYG 培地

に植菌し、37°C で一晩培養した。ボツリヌス菌が増殖した培養液 10 mL を透析培養培地の透析チューブに加え、37°C で 2 日間培養した。C-Yoichi 全長型 HA-33 を 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) + 150 mM NaCl にて 1 mg/mL に調整し、0.22  $\mu$ m 滅菌フィルター (MERCK) に通し、10 mL ずつ C-Yoichi 透析培養液内液に加え、37°C で 72 時間インキュベートした。C-Yoichi 全長型 HA-33 を含む透析培養液内液を遠心分離 (10,000×G、20 min、4°C) し、培養上清を回収した。培養上清に対して硫酸アンモニウムを 60%飽和になるように加え、4°C で一晩静置した。沈澱を遠心分離 (10,000×G、20 min、4°C) にて回収し、50 mM Acetate buffer (pH 4.0) に溶解し、同 buffer にて一晩透析した。透析後、50 mM Acetate buffer (pH 4.0) + 100 mM NaCl で 3 時間透析し、遠心分離 (10,000×G、25 min、4°C) し、上清を 50 mM Acetate buffer (pH 4.0) + 100 mM NaCl で平衡化した High S 陽イオン交換クロマトグラフィーに負荷した。吸着したタンパク質を 0.1 M~1.0 M NaCl の直線濃度勾配により溶出した。HA-33 の C 末端切断は、SDS-PAGE とウエスタンブロットにより確認した。

## 6-2. ボツリヌス菌菌体懸濁液による HA-33 の切断試験

C-Yoichi 全長型 HA-33 に 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) を加え、50  $\mu$ g/50  $\mu$ l に調製した。C-Yoichi 透析培養液内液を遠心分離し、得られた菌体 2.5 mg に 50 mM Phosphate buffer (pH 6.0) 5  $\mu$ l 加え、菌体懸濁液とし、C-Yoichi 全長型 HA-33 に添加し、37°C で 5 日間インキュベートした。C-Yoichi 全長型 HA-33 切断の確認のため、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行った。



### 6-3. プロテアーゼ阻害剤による HA-33 切断阻害試験

C-Yoichi HA-33 の最終濃度が 50  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$  および EDTA  $\cdot$  2Na の最終濃度が 1、10、100 mM になるように 50 mM Phosphate buffer (pH 6.0) を加え、6-2 で得た菌体懸濁液を 5  $\mu\text{l}$  添加した。C-Yoichi 全長型 HA-33 の切断確認は SDS-PAGE およびウエスタンブロットを行った。

### 7-1. C-Yoichi 全長型 HA-33 の自己消化試験

C-Yoichi 全長型 HA-33 は自己消化により切断を受けるか調べた。C-Yoichi 全長型 HA-33 を無菌条件下で 0.22  $\mu\text{m}$  滅菌フィルター (Millex-GV) により無菌処理を行い、37°C で 1、2、3 および 4 日間インキュベートした。切断の確認のため SDS-PAGE を行った。

### 7-2. Trypsin による組換え体 dual-tag HA-33 切断試験

0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$  に調整した Trypsin と 2 章で作製した組換え体 dual-tag HA-33 を混合し無菌処理をした後、37°C で 24 時間インキュベートした。その後ウエスタンブロットを行い、tag が切断を受けているかの確認のため Anti-His、Anti-HA、Anti-FLAG 抗体を用いて、dual-tag HA-33 の検出を行なった。

### 第3節 結果

#### 1. HA-33 の自己消化

C-Yoichi 全長型 HA-33 を無菌処理した後、37°Cで1、2、3および4日間インキュベートした。ポジティブコントロールとした無菌処理を行っていない C-Yoichi 全長型 HA-33 を用いた。無菌処理をしていないポジティブコントロールの HA-33 は切断が確認できた。無菌処理後、37°Cインキュベートした HA-33 は切断を受けていなかった (Fig.1)。

#### 2. Trypsin の組換え体 dual-tag HA-33 切断能

0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$  に調整した Trypsin と組換え体 dual-tag HA-33 を混合し無菌処理をした後、37°Cで24時間インキュベートした。その後ウエスタンブロットを行い、tag が切断を受けているかの確認のため Anti-His、Anti-HA、Anti-FLAG 抗体を用いて、dual-tag HA-33 の検出を行なった。ネガティブコントロールとして Trypsin を添加していない dual-tag HA-33 を使用した。Trypsin 0.1  $\mu\text{M}$  では全ての抗体で検出された。1  $\mu\text{M}$  では Anti-His の検出が弱くなった。さらに、コントロール HA-33 と比べると Trypsin 10、100  $\mu\text{M}$  では分子量が減少していることが確認できた (Fig.2)。

#### 3. ボツリヌス菌培養溶液成分による HA-33 の切断

ボツリヌス菌培養液内に C-Yoichi 全長型 HA-33 を切断するプロテアーゼが含まれているかを調べた。C-Yoichi 培養溶液と組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 を混合し、SDS-PAGE に負荷したところ、C-Yoichi 全長型 HA-33 の分子量は C-Yoichi PTC を構成する vHA-33 と同じ分子量となった (Fig.3)。また、組換え

体 C-Yoichi 全長型 HA-33 を C-St 培養溶液と混合し、SDS-PAGE に負荷したところ、C-Yoichi 全長型 HA-33 の分子量は C-Yoichi vHA-33 と同じ分子量となった (Fig.4)。同様に組換え体 C-St HA-33 を C-Yoichi 培養溶液と混合し SDS-PAGE に負荷したところ、組換え体 C-St HA-33 の分子量は His-Tag が欠落し、培養溶液由来の C-St HA-33 と同じ分子量となった (Fig.5)。

#### 4. ボツリヌス菌 菌体成分による C-Yoichi HA-33 の切断

C-Yoichi 全長型 HA-33 の切断を引き起こすプロテアーゼが菌体あるいは培養上清に含まれているかを調べるために、菌体と組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 を混合した。SDS-PAGE に負荷したところ、組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 の分子量は C-Yoichi vHA-33 と同じとなった (Fig.6)。

#### 5. ボツリヌス菌体成分による C-Yoichi HA-33 の切断に対する EDTA の効果

菌体に含まれているプロテアーゼが金属プロテアーゼであるかを調べるために、EDTA・2Na、C-Yoichi 菌体、全長型 HA-33 と混合した。SDS-PAGE に負荷したところ、組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 の分子量の変化は低減した (Fig.7)。

#### 第4節 考察

ボツリヌス毒素複合体は経口摂取されることにより、小腸まで到達し、ボツリヌス毒素複合体の構成成分である HA-33 が小腸上皮細胞の糖鎖と結合を増加することによって毒素の体内への侵入を促進する。Sagane らは、C-Yoichi HA-33 の C 末端アミノ酸配列解析によって、C 末端 31 アミノ酸残基が欠落することを見出した。同様に、HA-33 の C 末端欠落をしている D-1873 が知られている (Sagane, Y., et al., 2001)。しかし、C-Yoichi HA-33 の C 末端欠落を引き起こす要因は明らかとなっていない。本研究では、C-Yoichi HA-33 の C 末端 31 アミノ酸残基欠落を引き起こすメカニズムを調べた。HA-33 を無菌処理し、37°C、4 日間インキュベーションを行ったところ、分子量は変化せず、自己消化によるものではないことが明らかとなった。そのため、C-Yoichi HA-33 の C 末端アミノ酸残基の欠落要因をプロテアーゼと考えた。そこで C-Yoichi 培養溶液に組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 を混合したところ、C-Yoichi vHA-33 と同じ分子量となり切断を受けたことが明らかとなり、C-Yoichi 培養溶液には HA-33 を切断するプロテアーゼの存在が考えられた (Fig.3)。また、C-Yoichi 培養溶液のみに C-Yoichi HA-33 を切断するプロテアーゼが含まれているかを調べるため、組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 を C-St 培養溶液と混合した。組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 は C-Yoichi vHA-33 と同じ分子量となり、C-St 培養溶液でも同様に切断を受けた (Fig.4)。すなわち、C 末端を切断するプロテアーゼは C-Yoichi が特異的に産生するプロテアーゼではないことが考えられる。C-Yoichi HA-33 がアミノ酸配列特異的に切断を受けているかを確認するため、同様に組換え体 C-St HA-33 を C-Yoichi 培養溶液と混合した。組換え体 C-St HA-33 は切断を受けなかった

(Fig.5) ことから、C-Yoichi および C-St の培養溶液中に C-Yoichi HA-33 の C 末端を特異的に切断するプロテアーゼが含まれていることが考えられた。次に、C-Yoichi 培養溶液を遠心分離し、培養上清および菌体に分離した。C-Yoichi 菌体と C-Yoichi 全長型 HA-33 を混合したところ、C-Yoichi HA-33 の分子量の変化が見られた (Fig.6)。そのため、菌体に含まれるプロテアーゼが C-Yoichi HA-33 を切断することが考えられる。ボツリヌス菌が産生するプロテアーゼにはセリンプロテアーゼである Clostripain があり、BoNT、HA-70 の分子内切断を引き起こす (Suzuki, T., et al., 2009)。しかし、C-Yoichi HA-33 を切断するプロテアーゼの性状は明らかとなっていない。そこで、C-Yoichi HA-33 の欠落は金属プロテアーゼによるものかを調べるために、キレート剤である EDTA を添加したところ、分子量の変化は見られなかった (Fig.7)。この結果から、C-Yoichi 菌体に含まれるプロテアーゼは金属プロテアーゼ様であることが考えられた。今後、C-Yoichi vHA-33 のプロテアーゼによる欠落メカニズムが明らかとなることで、vHA-33 の大量精製および vHA-33 の細胞特異的な機能を用いてガラクトース糖鎖が大量に発現している癌細胞などの細胞診断に利用できると考える。

## 第5節 要約

ボツリヌス菌 C 型菌 Yoichi 株が産生する vHA-33 の欠落メカニズムの解明を試みた。C-Yoichi 全長型 HA-33 は無菌条件下、37°C インキュベートで切断を受けないことから自己消化ではないことが明らかとなった。C-Yoichi 培養液に全長型 HA-33 を混合したところ、切断を受け vHA-33 に変化していることが確認できた。さらに、C-St 培養液に全長型 HA-33 を混合したところ、切断を受け vHA-33 に変化していることが確認できた。C-Yoichi 培養液に C-St HA-33 を混合したところ、His-tag のみの切断が確認できた。すなわち、HA-33 はボツリヌス培養液に含まれるプロテアーゼが要因で切断を受けていることが考えられた。そこで、ボツリヌス菌体を分離し、菌体と全長型 HA-33 を混合したところ切断を受け vHA-33 に変化することが確認できた。EDTA・2Na、C-Yoichi 菌体、全長型 HA-33 と混合したところ切断を受けなかったことから、C-Yoichi 菌体が産生しているプロテアーゼは金属プロテアーゼ様であることが考えられた。

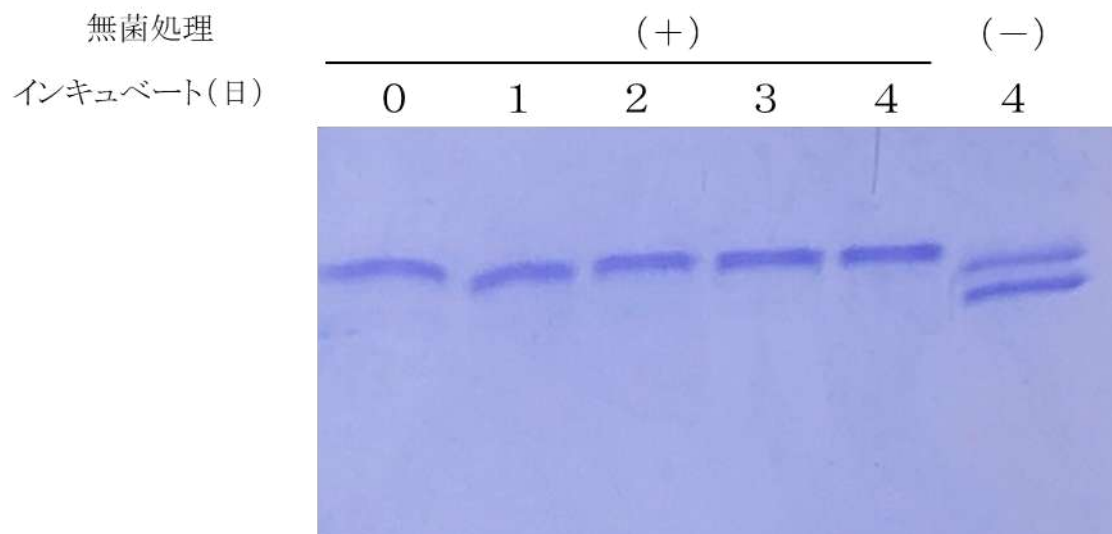


Fig.1 C-Yoichi HA-33 無菌条件下による自己消化試験

左レーンから無菌処理をしたインキュベート0、1、2、3、4日の C-Yoichi 全長型HA-33。

右端のレーンは無菌処理をしていないインキュベート4日のC-Yoichi 全長型HA-33。

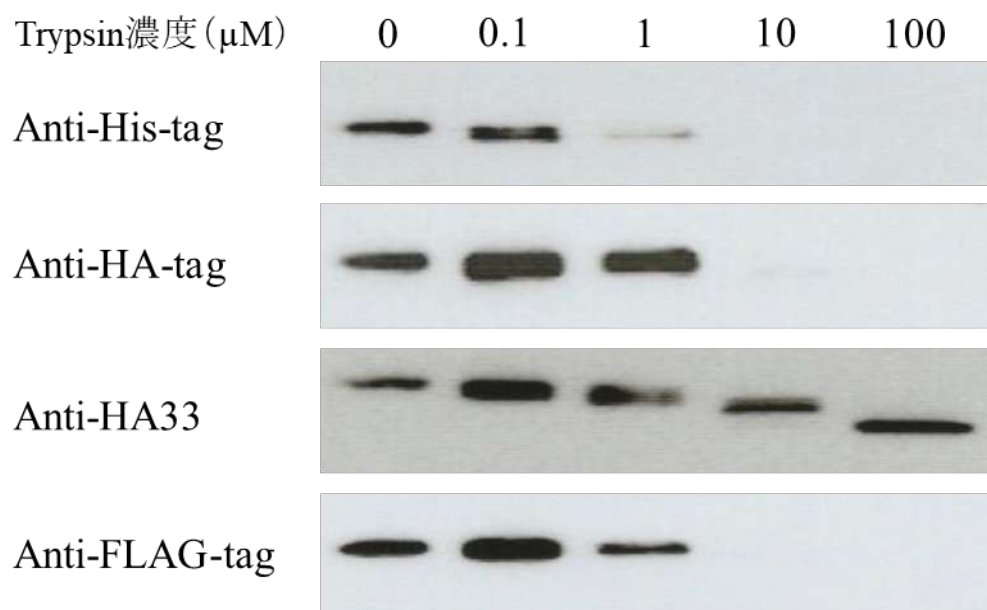


Fig.2 Trypsin処理による dual-tag HA-33の切断試験

dual-tag HA-33 を使用した。左から Trypsin 濃度 0、0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$ 。

上から Anti-His、Anti-HA、Anti-HA-33、Anti-FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットで検出した。



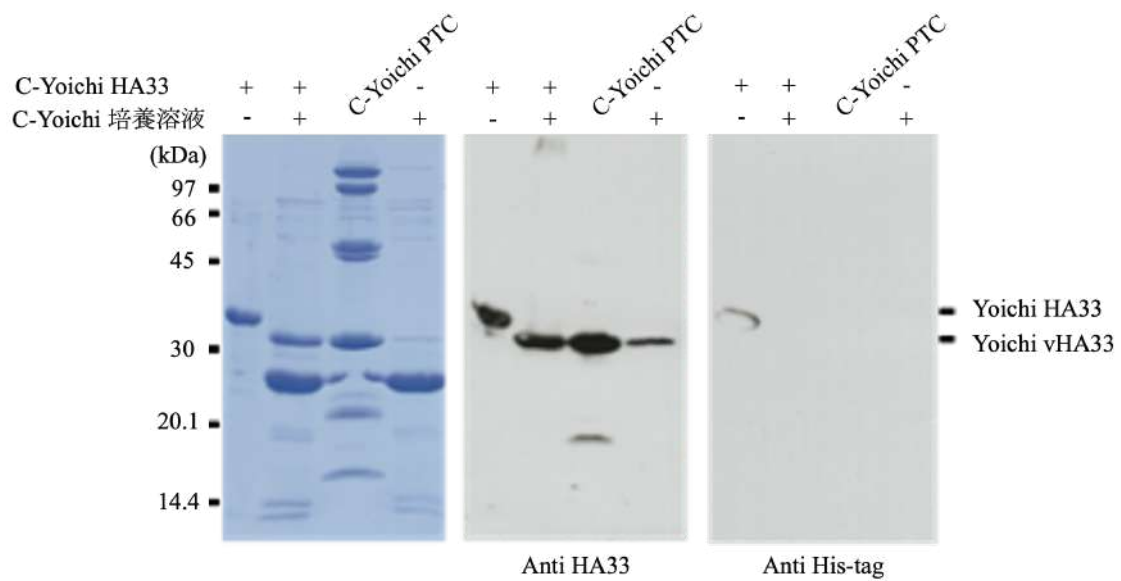


Fig.3 C-Yoichi 培養溶液による C-Yoichi HA-33 の切断

左の図は CBB 染色した SDS-PAGE、C-Yoichi HA-33 (+) が混合した。(-) が混合していない。C-Yoichi 培養液も同様。C-Yoichi PTC のレーンは C-Yoichi PTC のみを負荷した。真ん中の図は Anti HA-33 抗体で HA-33 を検出した。右の図は Anti His-Tag 抗体で His-Tag を検出した。

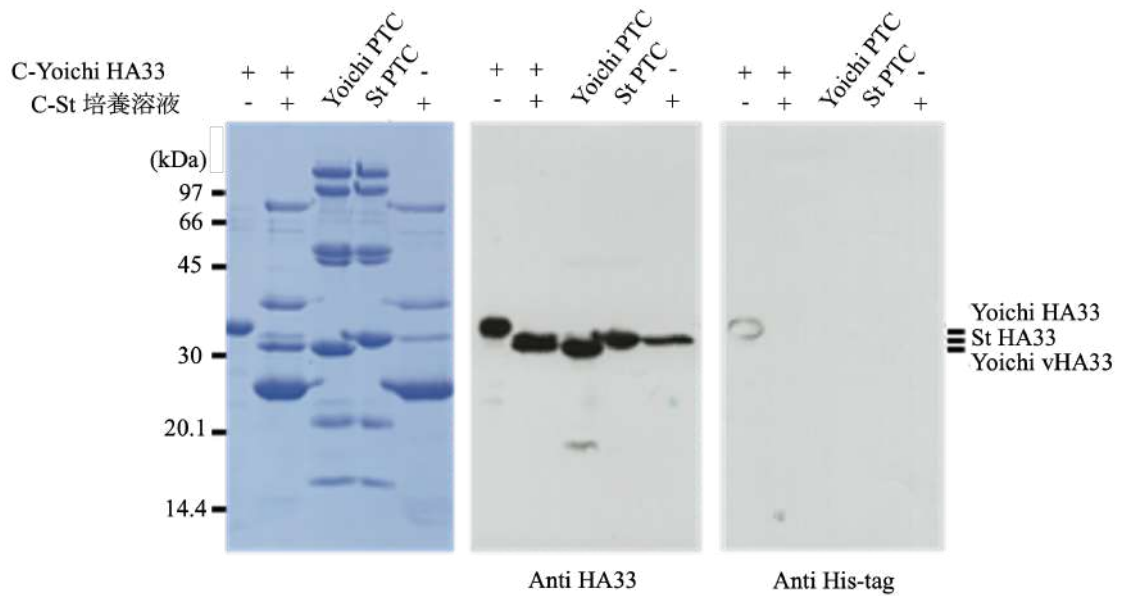


Fig.4 C-St 培養溶液による C-Yoichi HA-33 の切断

左の図は CBB 染色した SDS-PAGE、C-Yoichi HA-33 (+) が混合した。(-) が混合していない。C-St 培養液も同様。Yoichi PTC のレーンは Yoichi PTC のみを負荷した。St PTC のレーンは St PTC のみを負荷した。真ん中の図は Anti HA-33 抗体で HA-33 を検出した。右の図は Anti His-Tag 抗体で His-Tag を検出した。

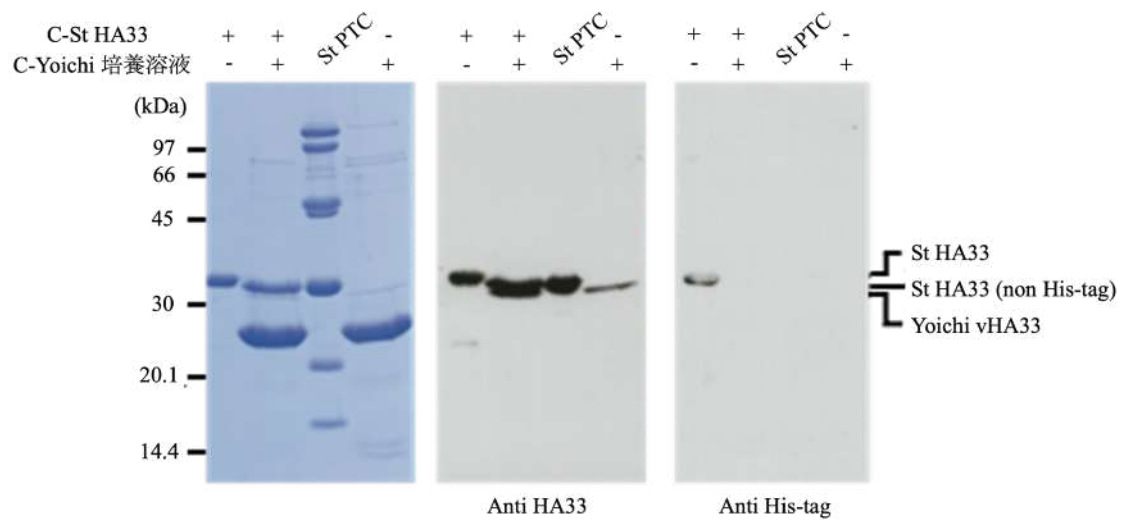


Fig.5 C-Yoichi 培養溶液成分による組換え体 C-St HA-33 の切断

左の図は CBB 染色した SDS-PAGE、C-St HA-33 (+) が混合した。(−) が混合していない。C-Yoichi 培養液も同様。St PTC のレーンは St PTC のみを負荷した。真ん中の図は Anti HA-33 抗体で HA-33 を検出した。右の図は Anti His-Tag 抗体で His-Tag を検出した。

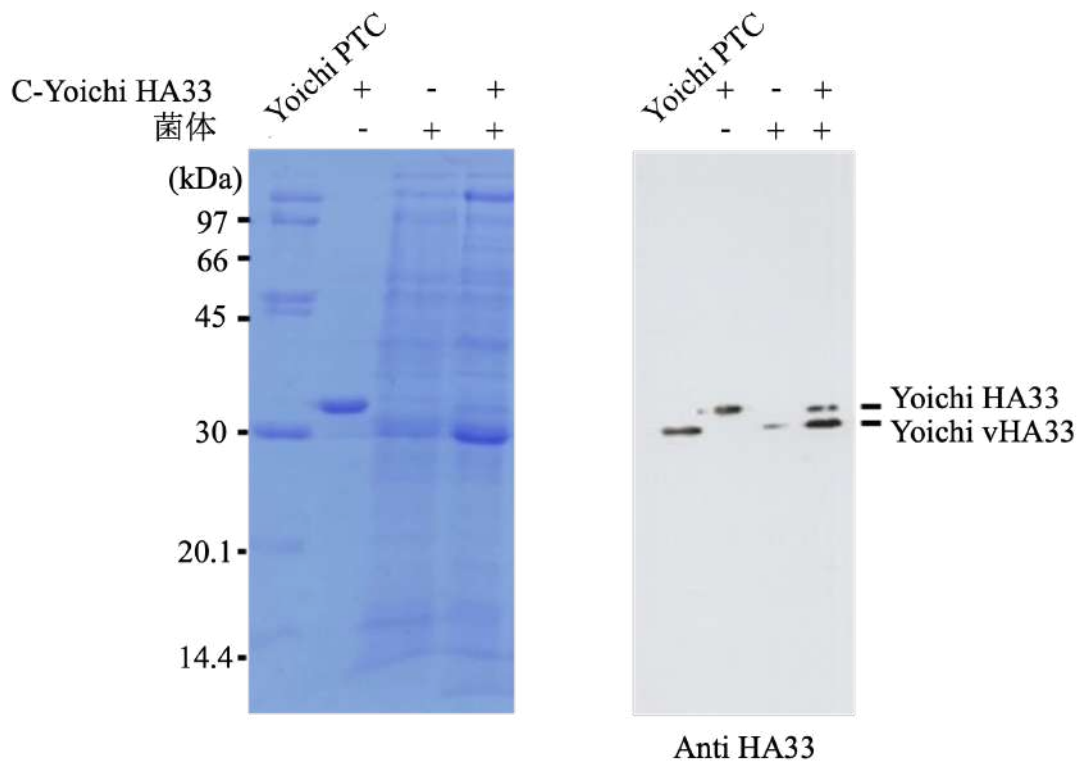


Fig.6 C-Yoichi 菌体成分による C-Yoichi HA-33 の切断

左の図は CBB 染色した SDS-PAGE、C-Yoichi 全長型 HA-33 (+) が混合した。(-) が混合していない。菌体も同様。Yoichi PTC のレーンは Yoichi PTC のみを負荷した。右の図は Anti HA-33 抗体で HA-33 を検出した。

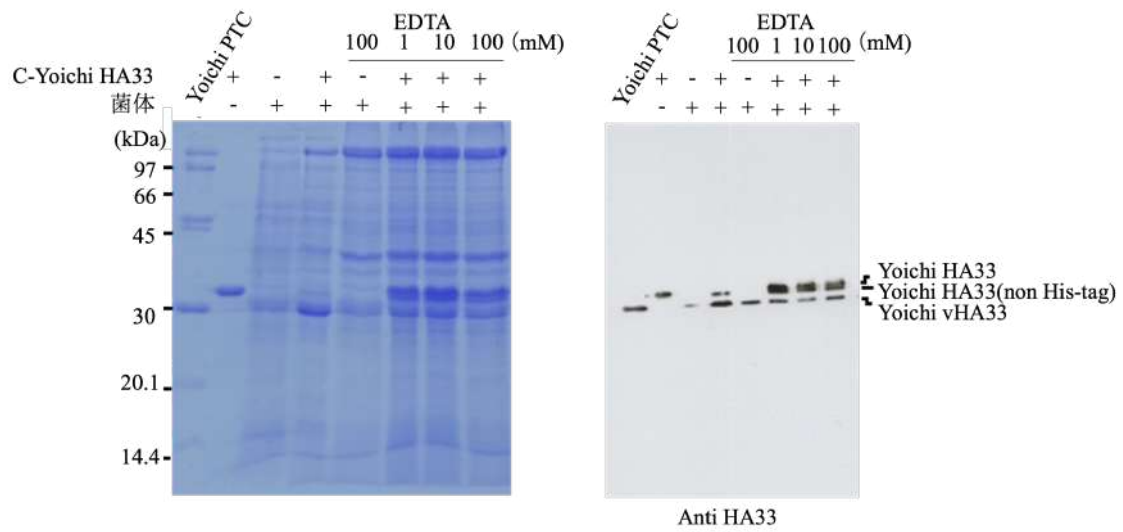


Fig.7 C-Yoichi HA-33 の C 末端切断に対する EDTA の効果

左の図は CBB 染色した SDS-PAGE、C-Yoichi 全長型 HA-33 (+) が混合した。(-) が混合していない。菌体、EDTA も同様。Yoichi PTC のレーンは Yoichi PTC のみを負荷した。右の図は Anti HA-33 抗体で HA-33 を検出した。

## 第4章 C-Yoichi および C-St 毒素複合体の細胞結合性

### 第1節 緒言

ボツリヌス菌が産生するボツリヌス毒素は BoNT と、無毒タンパク質と結合し、PTC を形成している。ボツリヌス血球凝集素である HA-70、HA-17 および HA-33 にはボツリヌス神経毒素を体内に輸送する役割がある。HA-70 は細胞のシアル酸を認識し、さらには、E-cadherin を破壊し毒素の吸収を促進する (Matsumura, T., et al., 2008) (Jin, Y., et al., 2009) (Sugawara, Y., et al., 2010) (Lee, K., et al., 2014)。HA-33 は細胞への結合にもっとも重要とされているタンパク質である (Ito, H., et al., 2011)。A 型 HA-33 は糖鎖のガラクトースに結合する (Fujinaga, Y., et al., 2000) (Fujinaga, Y., et al., 2004)。C 型 HA-33 は Gal、Neu5Ac、GalNAc に結合する。この他にも、HA-33 の構造と機能については多くの報告 (Nakamura, T., et al., 2008) (Mutoh, S., et al., 2005) (Nakamura, T., et al., 2007) があり、その全貌が徐々に明らかにされてきた。しかしながら、C-Yoichi が産生する HA-33 についての情報は乏しく、その構造と機能についての解析は、他の血清型の HA-33 に比べ著しく遅れていた。Sagane らは C-Yoichi PTC の HA-33 の C 末端 31 アミノ酸残基が欠落していることを明らかにした (Sagane, Y., et al., 2001)。Matsuo らは C-Yoichi 由来 PTC の血球凝集活性が糖で阻害されることを明らかにした (Matsuo, T., et al., 2011)。しかし、C-Yoichi 由来 PTC の細胞結合における糖の関与は不明である。本章では C-Yoichi 由来 PTC の細胞結合に寄与する糖について検討した。

## 第2節 実験方法

### 1. 細胞の培養

細胞は、ラット小腸上皮株化細胞 (Rat small intestine epithelial cells; IEC-6; Riken BioResource Center) を用いた。IEC-6 の培養液は次のように調製した。市販の Dulbecco's Modified Eagle Medium-low glucose に非働化した牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS, Thermo Scientific) 58 mL および、Penicillin (10,000 U/mL, Sigma) 5.8 mL を Millex®-GS Syringe Driven Filter Unit で濾過滅菌し DMEM に加えて、FBS を 10% 含む DMEM を調整し、培養液とした。IEC-6 は 10 mL の培養液を入れた Tissue Culture dish (直径 100 mm; Becton Dickinson) を用いて、CO<sub>2</sub> 濃度を 5% に保った CO<sub>2</sub> インキュベーター (MCO-5AC, SANYO) 内で培養した。IEC-6 がコンフルエントの状態に達したことを倒立型位相差顕微鏡 (Axiovert 40, Carl Zeiss) で確認し、実験に用いた。

### 2. 細胞結合試験

IEC-6 に対する結合試験のために、IEC-6 を 24 穴マルチウェルプレート (直径 1.6 cm, Corning) に播種し、37°C でインキュベートを行い、コンフルエントになるまで培養した。プレートの培養液を捨て、PBS で洗浄し、C-St 由来 PTC および C-Yoichi 由来 PTC を牛胎児血清の含まない DMEM 150  $\mu$ L に懸濁し、4°C で培養皿に添加し、4°C で 45 分インキュベートした。その後、PBS で 3 回洗浄し、100  $\mu$ L の SDS Sample Buffer を加え、細胞を溶解後、1.5 ml 容エッペンチューブに回収し、10 分間煮沸した。細胞に結合したタンパク質は、SDS-PAGE に供し、Western blot により検出した。

#### 5. ノイラミニダーゼ (NDase) 処理

IEC-6 を、DMEM 培養液 (pH 7.0) 中で 0、5、10 および 50 mU の *Clostridium perfringens* neuraminidase (NDase; Sigma-Aldrich) と 37°C で 18 時間インキュベートし、リン酸緩衝塩水で 3 回洗浄し細胞結合試験に使用した。

#### 6. 糖による細胞結合阻害試験

0、5、10 および 50 mM の糖類を室温で 15 分間、C-Yoichi 由来 PTC と混合した。各混合物を NDase 処理した IEC-6 に添加し、4°C で 45 分間インキュベートした。結合した PTC は、ウエスタンブロットを用いて検出した。



### 第3節 実験結果

#### 1. C-Yoichi および C-St 由来 PTC の IEC-6 細胞結合性

毒素濃度 3~100 nM の C-Yoichi および C-St 由来 PTC を用いて、IEC-6 (ラット小腸上皮細胞株) で細胞結合能を検討した。Fig. 1 に示すように IEC-6 細胞に結合した毒素の量は、C-Yoichi および C-St 由来 PTC のいずれにおいても濃度依存的に増加した。また、C-St 由来 PTC は C-Yoichi 由来 PTC よりも多く細胞に結合しており、C-St 由来 PTC は C-Yoichi 由来 PTC よりも IEC-6 細胞に対して相対的に高い親和性を有していることが示された。

#### 2. C-Yoichi および C-St 由来 PTC の NDase 処理を行なった IEC-6 への結合性

細胞に NDase 処理をすることで、細胞の糖鎖末端の Neu5Ac (Sia) が切断され、Gal が末端に露出する。これにより C-Yoichi 由来 PTC の結合力が変化するのかわを確認した。細胞結合アッセイの前に、IEC-6 細胞に対し 0~50 mU の NDase を添加し、酵素処理を行った。Fig. 2 に示すように、C-Yoichi 由来 PTC の細胞結合能は有意に増加した。一方、C-St 由来 PTC の IEC-6 細胞への結合量は、NDase 処理による影響を受けなかった。すなわち、C-Yoichi 由来 PTC は NDase 処理された細胞の Gal 糖末端に結合することが確認できた。

#### 3. C-Yoichi および C-St 由来 PTC の NDase 処理を行なった IEC-6 細胞への糖結合阻害試験

C-Yoichi 由来 PTC の細胞への結合に対する糖の阻害効果を検討した。C-Yoichi 由来 PTC の細胞糖結合阻害試験では Neu5Ac、Gal、Lactulose (LAU) および isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) の糖を用い 0~50 mM の濃度に分け、

C-Yoichi 由来 PTC と混合し、50 mU NDase 処理した IEC-6 に対し結合するかを確認した。Fig. 3 に示したように Neu5Ac の添加では細胞結合性に変化は見られなかった。しかし、Gal および Gal 糖を含む LAU および IPTG は 50 mM で細胞結合性が著しく下がり 10 mM でも結合性が下がることが確認された。すなわち、C-Yoichi 由来 PTC の HA-33 はガラクトース糖と先に結合することで細胞結合能を失うことが示唆された。一方、Neu5Ac は C-Yoichi 由来 PTC の細胞への結合に影響を与えなかった。

#### 第4節 考察

ボツリヌス C 型菌 Stockholm 株が産生する PTC の HA-33 は糖結合 site が 2 つある。しかし、ボツリヌス C 型菌 Yoichi 株が産生する PTC は C 末端 31 アミノ酸残基が欠落し、HA-33 の構造が変化している。Matsuo らの研究により C-Yoichi 由来 PTC はガラクトースを特異的に認識することが知られている (Matsuo, T., et al., 2011)。本研究では、C-Yoichi および C-St 由来 PTC の細胞結合性を確認した。C-Yoichi 由来 PTC は C-St 由来 PTC と比較して無処理の IEC-6 に対して細胞結合能が低いことが確認できた。C 型 PTC は細胞表面のシアリルオリゴ糖鎖を認識するためだと考えられる (Nakamura, T., et al., 2007) (Nishikawa, A., et al., 2004)。しかし、NDase 処理濃度依存的に C-Yoichi 由来 PTC の結合能は上昇することが確認できた。Nakamura らは C 型 HA-33 の変異体を作製し、Neu5Ac 認識部位 site 1 を変異させた。変異体は、Neu5Ac 認識を失い、Gal に対して高い結合性を持つことを示した (Nakamura, T., et al., 2008)。すなわち、C-Yoichi 由来 PTC は C 末端欠落あるいは変異により、細胞の Gal 糖鎖を特異的に認識することが考えられる。一方、C-St 由来 PTC は NDase 処理した IEC-6 に対しても結合能に変化は見られなかった。これは C-St 由来 PTC の糖認識部位が 2 つあり、それぞれ Neu5Ac、Gal を認識することができるため (Nakamura, T., et al., 2008)、NDase 未処理あるいは処理後でも、細胞結合能に変化はなかったことが考えられる。C-Yoichi 由来 PTC 細胞糖阻害試験では、Neu5Ac との反応では細胞結合能に変化は見られなかったが、Gal を含む糖 (LAU、IPTG) と反応させることで細胞結合能が下がることが確認できた。このことは、C-Yoichi 由来 PTC は Gal 糖を含む糖に HA-33 の結合 site がブロックされることで細胞結合性を失ったこと

を示唆している。Nakamura らは等温滴定カロリメトリーにより C 型菌由来 HA-33 の site1 ノックアウト変異体に対する糖結合性を調べたところ、C 型菌由来 HA-33 の site1 ノックアウト変異体は Neu5Ac に結合せず、 $K_d$  値が高すぎて測定不能になることを示している (Nakamura, T., et al., 2011)。すなわち、C-Yoichi 由来 PTC も同様に site1 に構造変異が入っているため Neu5Ac を認識できず、Neu5Ac と混合しても細胞結合性に変化が見られなかったと考える。本研究により、C-Yoichi 由来 PTC は細胞のガラクトース糖に強く結合性を示すことが明らかとなった。

## 第5節 要旨

C-Yoichi HA-33 は C 末端 31 アミノ酸残基が欠落し、構造が変化している。

C 末端 31 アミノ酸残基が欠落した C-Yoichi HA-33 の機能を確認するために、本研究では C-Yoichi および C-St 由来 PTC の細胞結合性を確認した。IEC-6（ラット小腸上皮株化細胞）に対して、C-Yoichi および C-St 由来 PTC の細胞結合性を比較した所、C-Yoichi 由来 PTC は C-St 由来 PTC よりも細胞結合能が低いことが確認できた。しかし、細胞のシアル酸糖鎖末端を切断し、糖鎖末端をガラクトースに変化させる NDase 処理をした IEC-6 に対して C-Yoichi 由来 PTC は NDase 濃度依存的に結合能が上昇することが確認できた。このことから、C-Yoichi 由来 PTC は細胞の Gal 糖鎖を特異的に認識することが示唆された。細胞糖阻害結合試験では、Sia で C-Yoichi HA-33 を前処理しても細胞結合性に変化は見られなかったが、Gal を含む糖（LAU、IPTG）と反応させることで細胞結合能が下がることが確認できた。本研究により、C-Yoichi 由来 PTC は細胞のガラクトース糖鎖に強く結合性を示すことが明らかとなった。

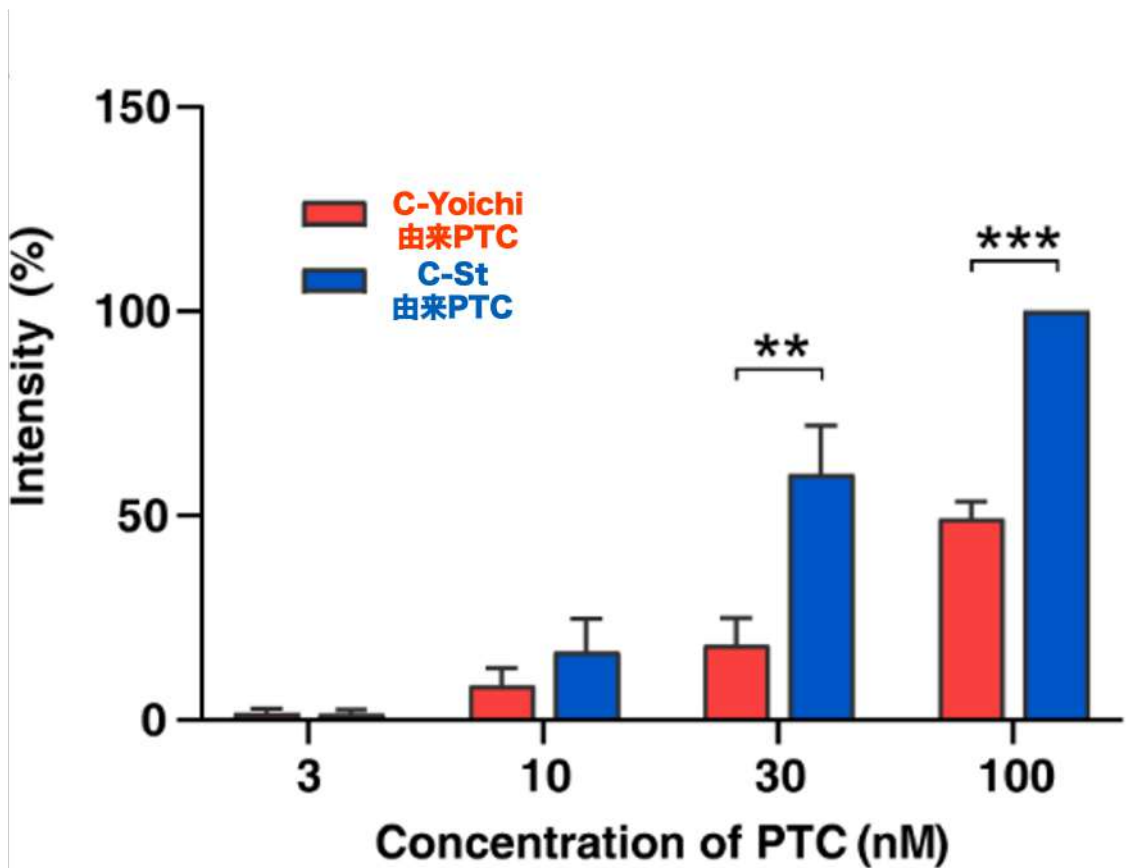


Fig.1 C-Yoichi および C-St 由来 PTC の IEC-6 細胞結合性

培養細胞を C-Yoichi または C-St 由来 PTC とともに 4°C で 45 分間インキュベートした。細胞は PBS で洗浄し、溶解させた。細胞内の結合した PTC は、抗 HA-33 抗体を用いて検出した。Tubulin をローディングコントロールとして使用した。表示された PTC 濃度での結合強度を示し、100 nM C-St 由来 PTC で得られた強度を 100% とする。実験は 3 回繰り返し、エラーバーは平均の SE を表す。統計解析は Sidak の検定を用いて行った (\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ )。

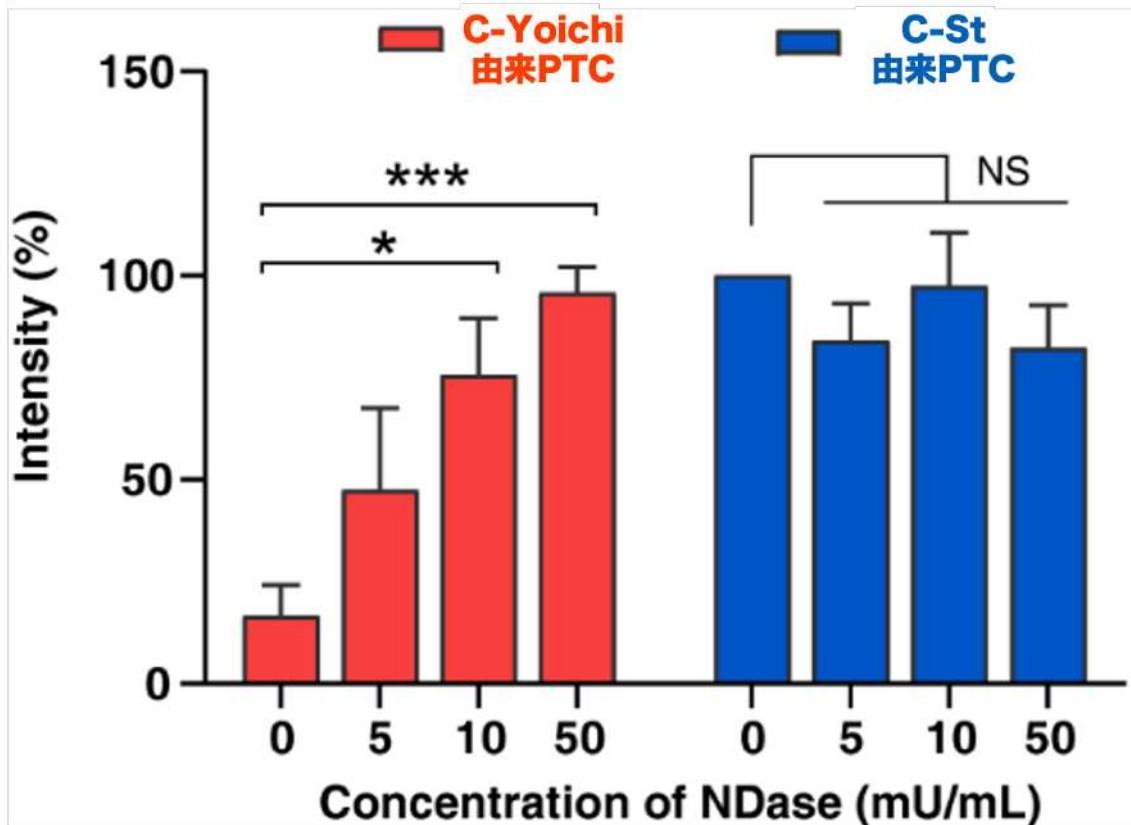


Fig.2 C-Yoichi および C-St 由来 PTC の NDase 処理を行なった IEC-6 細胞結合性細胞は、0~50 mU 濃度の NDase で 37°C、18 時間処理された。その後、細胞を PBS で洗浄し、100 nM の C-Yoichi または C-St 由来 PTC と 4°C で 45 分間インキュベートした。HA-33 タンパク質の検出は、Fig.1 で述べたように行った。Fig.2 のローディングコントロールは Actin とした。示した NDase 濃度に対する結合強度を示し、100%は C-St 由来 PTC に対する NDase 未処理細胞の結合強度を表す。実験は3回繰り返し行い、エラーバーは平均の SE を表す。統計解析は Tukey's test を用いた (\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.1$ ; NS: not significant) .

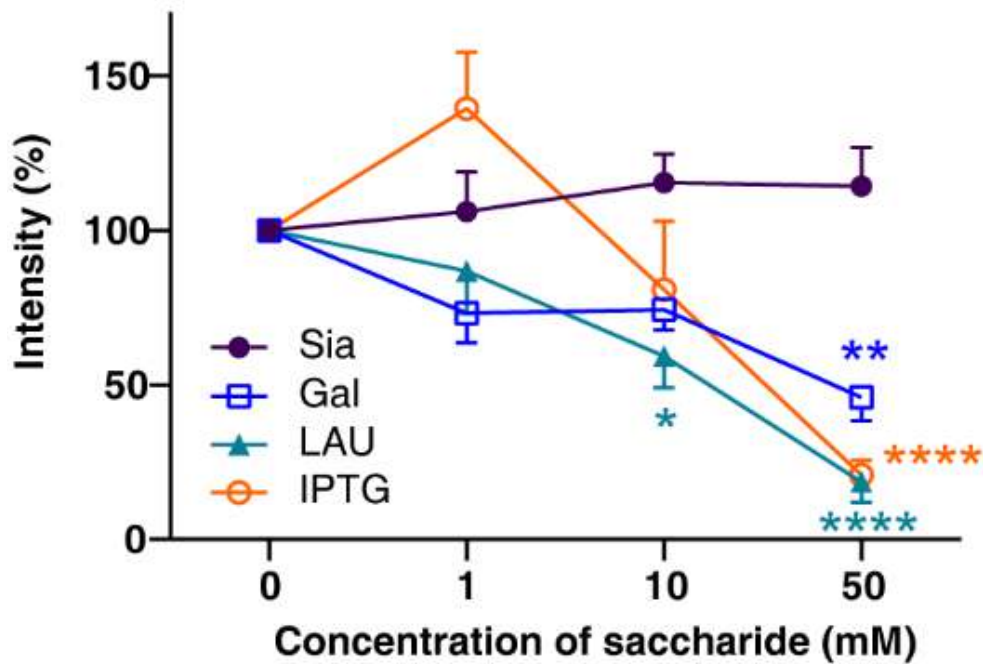


Fig.3 C-Yoichi 由来 PTC の NDase 処理を行なった IEC-6 細胞への糖結合阻害試験

C-Yoichi 由来 PTC を 0~50 mM 濃度の糖と 15 分間混合した。NDase 処理した細胞 (50 mU) をこの混合物と一緒に 4°C で 45 分間インキュベートした。Fig.3 のローディングコントロールは Actin とした。50 mU NDase 処理した、0 mM の 100% は糖類を含まない細胞結合試験で観察された強度を表す。実験は 3 回繰り返し行い、エラーバーは平均の SE を表す。統計解析は Tukey's test を用いて行った ( $***P < 0.0001$ ,  $**P < 0.01$ ,  $*P < 0.1$ )。



## 第5章 C-Yoichi および C-St 毒素複合体のマウス腹腔内および経口毒性

### 第1節 緒言

食品媒介性ボツリヌス症は、BoNT に汚染された食品を摂取することにより発症する。BoNT は Zn 依存性のメタロプロテアーゼ活性により神経伝達物質の放出に関与する特定のタンパク質を切断し、筋麻痺を引き起こす (Rossetto, O., et al., 2014)。Clostridium botulinum が産生する BoNT は、培養液中では NTNHA と結合し、BoNT/NTNHA 複合体 (M-PTC) を生成する。さらに、3 種類の HA (3 分子の HA-70、3 分子の HA-17、6 分子の HA-33 が M-PTC と結合し、L-PTC を形成している (Hasegawa, K., et al., 2007) (Kouguchi, H., et al 2002)。経口摂取された BoNT は、いくつかのバリアに遭遇する。そのようなバリアの一つが腸管壁である。BoNT は単独でも腸の上皮細胞を通して輸送されるが、HA タンパク質は、その糖鎖結合部位を介して PTC の経上皮吸収を促進する。Tsuzuki らの研究では、C-St 培養液から精製した HA-33/HA-55 複合体が HA 活性を示すことが報告された (Tsuzuki, K., et al., 1990)。さらに、Inoue らは、C および D 型の HA 活性を示す PTC が Neu5Ac 部位を介して赤血球に結合することを報告している (Inoue, K., et al., 2001)。Kouguchi らも、C 型から分離した HA-33 の赤血球への結合を示している。また、C 型菌 6814 株由来 PTC から分離された HA-33 は Neu5Ac の添加により赤血球への結合が阻害されることを示した (Kouguchi, H., et al., 2001)。すなわち、C 型の PTC では、HA-33 と Neu5Ac との相互作用が赤血球凝集に関与している可能性が最も高い。Sagane らは、C-Yoichi が赤血球凝集活性を示さない変異 PTC を産生することを見出した (Sagane, Y., et al., 2001)。C-Yoichi 由来 PTC のアミノ酸配列を、血球凝集能のある C-St 由来 PTC

と比較したところ、これら 2 株の HA-33 は 74%の類似性しかないが、他の毒素複合体成分は 99%~100%の類似性を有していた (Fig.1) (Sagane, Y., et al., 2001) (Fujinaga, Y., et al., 1994) (Tsuzuki, K., et al., 1990) (Sakaguchi, Y., et al., 2005) (Kimura, K., et al., 1990)。HA-33 のアミノ酸残基の置換は C 末端半分に限定されており、C-Yoichi および C-St 由来 HA-33 の C 末端側は 46%のアミノ酸配列類似性と低い値を示している。さらに、C-Yoichi HA-33 の C 末端は 31 アミノ酸残基が欠落しており (Sagane, Y., et al., 2001)、おそらく細菌が産生する内因性プロテアーゼによるタンパク質分解に対して感受性が高いためであると考えられる (本論文第 3 章参照)。したがって、C-Yoichi 由来 PTC の低い HA 活性は、HA-33 の C 末端ドメインの変異、C 末端残基の欠失、あるいはその両方に起因している可能性がある。一方、Matsuo らは、C-Yoichi 由来 PTC が NDase で処理した赤血球の血球凝集を促進することを見だし、C-Yoichi 由来 PTC から分離した HA-33/HA-17 の 3 量体は、NDase で処理した IEC-6 細胞に結合することを示している (Matsuo, T., et al., 2011)。このように、いくつかの研究から、C-Yoichi 由来 PTC に見られる HA-33 のアミノ酸変異は、毒素と細胞との結合に関わる糖認識の変化をもたらすことが示唆された。しかし、この変化が経口毒性に及ぼす影響については不明である。本章では、HA-33 のアミノ酸変異による、PTC の経口毒性が野生型毒素よりも向上することを明らかにした。

## 第2節 実験方法

### 1. 動物実験

本実験におけるすべての動物実験プロトコルは、日本学術会議が公布した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に記載されている内容に従って実施され、東京農業大学の動物実験委員会の承認を受けた。

### 2. 神経細胞培養

妊娠中のラットは Charles River Laboratories から購入した。24 ウェルプレートに poly-D-lysine (0.1 mg/mL) をコートし、37°Cで 3 時間インキュベートした後、滅菌超純水で 3 回洗浄した。ラット大脳皮質初代ニューロンは、生後 19 日目の胚からパパイン解離キット (Worthington Biochemical Corporation) を用いて調製した。妊娠ラットを CO<sub>2</sub> 窒息により安楽死させ、胚を取り出した。解剖した大脳皮質組織をパパイン溶液で 37°C、60 分間解離させた。皮質神経細胞を 250,000 cells/well の密度で播種した。

### 3. C-Yoichi および C-St 由来 PTC のマウスに経口および腹腔内投与

各試験には、雌の Crl:CD1 (ICR) マウス (4~5 週齢、19~30g ; Charles River Laboratories) を 4~6 匹セットで使用した。経口毒性試験では、リン酸-ゼラチン緩衝液 (10 mM リン酸緩衝液および 0.2% ゼラチン、pH 6.2) 中の C-Yoichi および C-St 由来 PTC を 200  $\mu$ L ポッパ針を用いて経口投与し、マウスに投与した。腹腔内毒性試験では、注射器 (26G 針) を用いて、リン酸-ゼラチン緩衝液

(500  $\mu$ L) 中の C-Yoichi および C-St 由来 PTC をマウスに投与した。投与後、最大 5 日間マウスを観察し、ボツリヌス中毒の症状の有無を確認した。

#### 4. C-Yoichi PTC と糖の混合

リン酸-ゼラチン緩衝液を用いて C-Yoichi PTC を 0.05  $\mu$ g に希釈し、250 mM または、500 mM の IPTG、LAU になるよう混合し、室温で 15 分静置し、マウス経口毒性試験に用いた。

#### 5. ウェスタンブロッティング

ニューロンは、37°C で 12 時間、BoNT/C に曝露された。細胞を PBS で 1 回洗浄し、200  $\mu$ L の溶解バッファー [1% Triton X-100, 0.05% SDS, プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) 含有 PBS] で溶解した。ライセートを最高速度で 4°C、10 分間遠心分離した。上清を使用するまで -80°C で保存し、SDS サンプルバッファー [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 7.5% glycerol, and 0.005% bromophenol blue] と混合した。12.5% ポリアクリルアミド分離ゲルと 4.5% ポリアクリルアミド濃縮ゲルにより構成されたゲルを用いた。分子量マーカーに DynaMarker® Protein MultiColor Stable II を用いた。泳動は 120 V 濃縮ゲル、分離ゲルの定電流で行った。SDS-PAGE により分離後、Nitrocellulose 膜 (Amersham TM Hybond TM -ECL, GE Healthcare) および 6 × 9 cm の濾紙を用いた。電気泳動のゲルを Semi dry buffer (0.58% Tris, 0.229% Glycine, 0.038% SDS, 20% Methanol) を用いてセミドライブロッティング装置 で Nitrocellulose 膜へ 20 V の定電圧で 25 分間エレクトロブロットした。その後、Nitrocellulose 膜を取り出し、5% Skim

milk を含む TBST (5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 13.8 mM NaCl, 0.27 mM KCl, and 0.05% Tween 20) をブロッキング液として、1 時間室温でブロッキングした。一次抗体 (抗 SNAP-25 抗体、抗 Syntaxin 抗体、抗 VAMP-2 抗体) をブロッキング液で 500 倍希釈した抗体に浸し、一晩 4°C で振盪した。TBST で Nitrocellulose 膜を洗浄 (10 分 × 3 回) し、二次抗体 (Anti-rabbit あるいは Anti-mouse IgG) をブロッキング液で 5,000 倍希釈した抗体に Nitrocellulose 膜を浸し、1 時間室温で振盪した。再び TBST で洗浄 (10 分 × 3 回) し、Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いてバンドを化学発光させた。化学発光を Light-Capture II (AE-6981/2 型 C/FC, ATTO) を用いて検出した。

### 第3節 実験結果

#### 1. 培養神経細胞

C-Yoichi および C-St 由来 PTC に含まれる BoNT が神経細胞に対して神経毒性を示すか確認するため、BoNT の特異的基質である SNARE タンパク質に対するタンパク質分解活性を評価した。ラット大脳皮質培養神経細胞に、C-Yoichi および C-St 由来の BoNT を種々の濃度で添加し、細胞内の SNARE タンパク質量の変化をウエスタンブロットで確認した。その結果、C-Yoichi および C-St 由来 BoNT では、シンタキシンと SNAP-25 の用量依存的な分解が同程度に観察された (Fig.2)。このことから、各株由来の BoNT は、標的タンパク質に対して同程度のタンパク質分解能を有していることが実証された。

#### 2. マウス腹腔内毒性試験

毒素の非経口毒性を比較するため、C-Yoichi および C-St 由来 PTC を 300 pg または 150 pg をマウスに腹腔内投与し、3 時間ごとに経過観察を行なった。C-Yoichi および C-St 由来 PTC 300 pg を腹腔内投与したマウスは、投与後 2 日ですべてのマウスがボツリヌス中毒を発症し安楽死させた (Fig. 3)。また、C-Yoichi および C-St 由来 PTC 150 pg を腹腔内投与したマウスの半数がボツリヌス中毒を起こし 3 日目に安楽死させた。これらの結果から、C-Yoichi および C-St 由来 PTC の腹腔内毒性は同等であり、HA-33 の変異は非経口毒性に影響を及ぼさないことを示した。

### 3. マウス経口毒性試験

毒素の経口毒性を比較するため、C-Yoichi および C-St 由来 PTC をマウスに経口投与し、3 時間ごとに経過観察を行なった (Fig. 4 および 5)。C-St 由来 PTC 5  $\mu\text{g}$  および 10  $\mu\text{g}$  経口投与したすべてのマウスは投与後 1~2 日でボツリヌス中毒を発症し、安楽死させた。また、C-St 由来 PTC 2.5  $\mu\text{g}$  を経口投与したマウスの半数は、投与後 2 日でボツリヌス中毒を発症し安楽死させた。C-St 由来 PTC 0.5  $\mu\text{g}$  を経口投与したマウスでは、すべてのマウスが生存した (Fig. 4)。一方、C-Yoichi 由来 PTC を 0.5~5  $\mu\text{g}$  経口投与したすべてのマウスは投与後 6~12 時間でボツリヌス中毒を発症し安楽死し、C-Yoichi 由来 PTC 0.05  $\mu\text{g}$  を経口投与したマウスの半数は 1~2 日でボツリヌス中毒を発症し安楽死させた。C-Yoichi 由来 PTC 0.005  $\mu\text{g}$  を経口投与したマウスはすべて生存した (Fig. 5)。経口毒性半数致死量 ( $\text{LD}_{50}$ ) を比較したところ、C-St 由来 PTC は  $\text{LD}_{50}$  が、2.287  $\mu\text{g}$  であり、一方、C-Yoichi 由来 PTC のそれは、0.025  $\mu\text{g}$  であった (Fig. 6)。すなわち、C-Yoichi 由来 TC の経口毒性は C-St 由来 PTC の約 90 倍であった。

### 4. C-Yoichi 由来 PTC のマウス経口毒性糖阻害試験

C-Yoichi 由来 PTC (0.05  $\mu\text{g}$ ) に 500 あるいは 250 mM の IPTG および LAU を混合したのち、混合液をマウスに経口投与し、経口毒性が阻害されるのかを確認した。コントロールとして糖非添加 PTC を用いた。投与後、3 時間ごとに経過観察を行なった。糖非添加 PTC を経口投与したマウスでは投与後 24~30 h に半数のマウスがボツリヌス中毒を起こし安楽死させた。250 mM IPTG を混合した PTC 経口投与区では 28~30 h 半数のマウスがボツリヌス中毒を起こし安楽死さ

せた。500 mM IPTG を混合した区では 28 時間経過後に 1 匹のマウスがボツリヌス中毒を起こし安楽死させた。250 mM LAU を混合した経口投与では 72 時間後 1 匹のマウスがボツリヌス中毒を起こし安楽死させた。500 mM LAU を混合した経口投与ではすべてのマウスが生存した (Fig.7)。



#### 第4節 考察

ボツリヌス C 型菌 Yoichi 株が産生する PTC は C 型菌 Stockholm 株が産生する PTC とは HA-33 を除くすべての構成成分のアミノ酸配列の相同性が 99~100% である。一方、HA-33 のみ 74%の相同性を示す。本実験は HA-33 のアミノ酸配列が異なることで経口毒性が変化することを明確に示した。マウス腹腔内実験の結果では C-Yoichi および C-St 由来 PTC のマウス腹腔内毒性はほぼ同じであった。すなわち、C-Yoichi および C-St 由来 PTC を構成する BoNT の毒性は同程度だと考えられる。一方で、マウス経口毒性では C-St 由来 PTC は 2.287  $\mu\text{g}$  で半数致死量であったが、C-Yoichi 由来 PTC では 0.025  $\mu\text{g}$  が半数致死量であった。すなわち、両者の間には、毒性に 90 倍もの差があった。C-Yoichi 由来 PTC は C 末端 31 アミノ酸残基が欠落し、C-St 由来 PTC とは異なる細胞結合性がある。腸管上皮細胞はムチンで覆われており、細菌やタンパク質を吸着させる役割がある。Nakamura らは C 型 HA-33 はブタ胃ムチン (PGM)、ウシ顎下線ムチン (BSM) に結合することを示している (Nakamura, T., et al., 2007)。すなわち、HA-33 はムチンに結合し、トラップされる可能性がある (Kim, Y., et al., 2010) (Hatstrup, C. L., & Gendler, S. J., 2008)。ムチン糖鎖は非還元末端にシアル酸糖鎖を持つものが多く (芦田久., 2016)、C-St 由来 PTC はムチンに吸着することで細胞内への侵入が防がれている可能性がある。C-Yoichi 由来 PTC はムチンへの吸着を免れ、細胞へ結合しやすいことが考えられる。しかし、HA 成分はムチンへの結合を介して、PTC の HT-29 への取り込みに寄与しているという報告もある (Nishikawa, A., et al., 2004) (Uotsu, N., et al., 2006)。この相違は、実験に使用されている細胞が正常細胞や腫瘍細胞などと実験ごとに異なっていること、

あるいは、*in vivo* と *in vitro* でムチンの環境が異なることによるものだと考えられる。マウス経口毒性糖阻害試験では、C-Yoichi 由来 PTC はガラクトースを含む難消化性の糖類 IPTG、LAU を混合することで、マウス経口毒性が少し弱まることが確認された。A 型 PTC でも同じように HA-33 は末端に Gal を持つ糖鎖を好むことが示されており (Yao, G., et al., 2014)、A 型 PTC でも IPTG および LAU での糖阻害によって毒性が減少していることが報告されている。(Lee, K., et al., 2013) (Lee, K., et al., 2015)。一般的な C 型 HA-33 は A 型 HA-33 とは異なる糖認識をする (Fujinaga, Y., et al., 2000) (Kouguchi, H., et al., 2001)。しかし、C-Yoichi 由来 PTC の HA-33 は A 型 PTC 同様 Gal 認識することから、IPTG または LAU と結合することにより、細胞への結合性が失われることでマウス経口毒性が弱まったものと考えられる。本研究では、C-Yoichi 由来 PTC のマウス経口毒性が C-St 由来 PTC と比べ約 90 倍もあることを明らかにし、C-Yoichi 由来 PTC は Gal を含む難消化性の糖類が結合することによりマウス経口毒性が弱まることを明らかにした。

## 第5節 要約

食中毒の原因物質である BoNT は、嫌気性細菌である *Clostridium botulinum* によって産生される。培養液中では、BoNT は NTNHA および HA タンパク質の複合体と会合し、毒素複合体 (PTC) を形成する。HA 複合体は3つの HA-70 タンパク質と、2つの HA-33 と1つの HA-17 からなる HA-33/HA-17 複合体の3つの腕状構造から構成されている。PTC は純粋な BoNT よりも高い経口毒性を示すので、食中毒には無毒のタンパク質が重要であると考えられている。C-Yoichi は、HA-33 の C 末端領域に多くのアミノ酸置換を有する PTC を産生する。今回、C-Yoichi 由来 PTC のマウス腹腔内毒性は、一般的な C 型菌である C-St 由来 PTC とほぼ同じであるが、マウス経口毒性は約 90 倍であることを明らかにした。C-Yoichi 由来 PTC の腸管上皮細胞株への細胞結合は NDase 処理により増加し、Gal と混合することにより阻害された。また、Gal を含む糖を C-Yoichi 由来 PTC と共投与すると、マウス経口毒性が軽減された。すなわち、C-Yoichi 由来 PTC が小腸上皮を介して体内に取り込まれる際には細胞表面糖鎖の Gal 部位に優位に結合していることが考えられる。

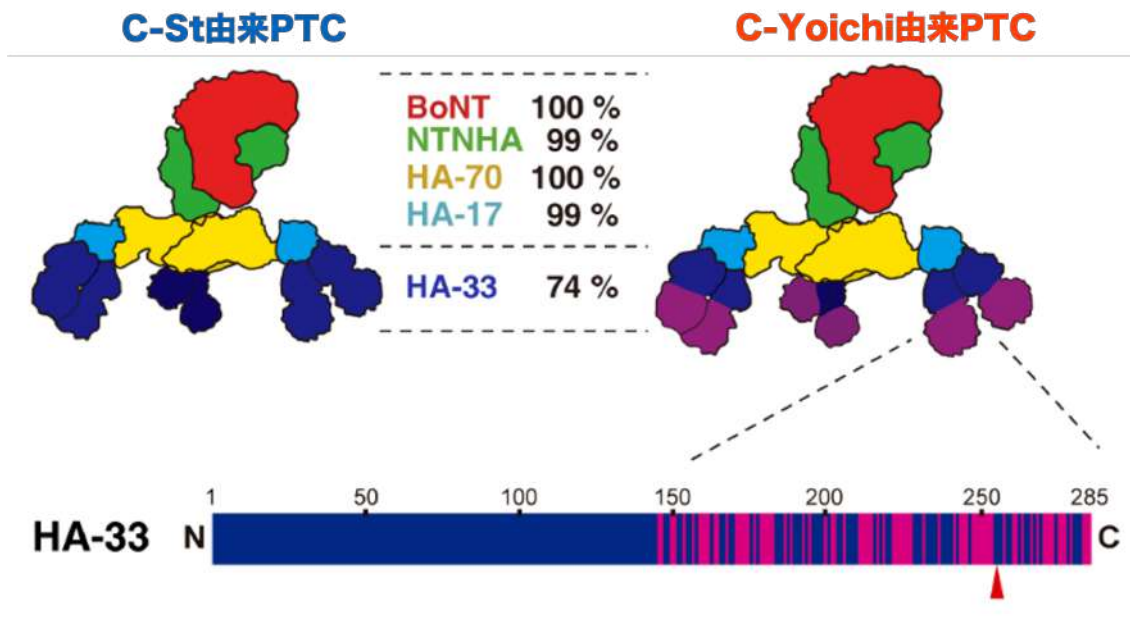


Fig.1 C-Yoichi および C-St 由来 PTC の構造比較

ボツリヌス神経毒素 (BoNT、赤)、無毒タンパク質 (NTNHA、緑 ; HA-70、黄 ; HA-17、水色 ; HA-33、青)。パーセントは PTC の各サブユニット間のタンパク質配列の類似性を示す。C-Yoichi 由来 PTC の HA-33 におけるアミノ酸変異は、下部にカラーボックスで示されている。青色のボックスは、C-Yoichi および C-St 由来 PTC の間で同一のアミノ酸配列を示し、マゼンタ色のボックスは、C-Yoichi および C-St 由来 PTC の間で不一致のアミノ酸配列を示す。赤い矢印は翻訳後切断部位を示す。

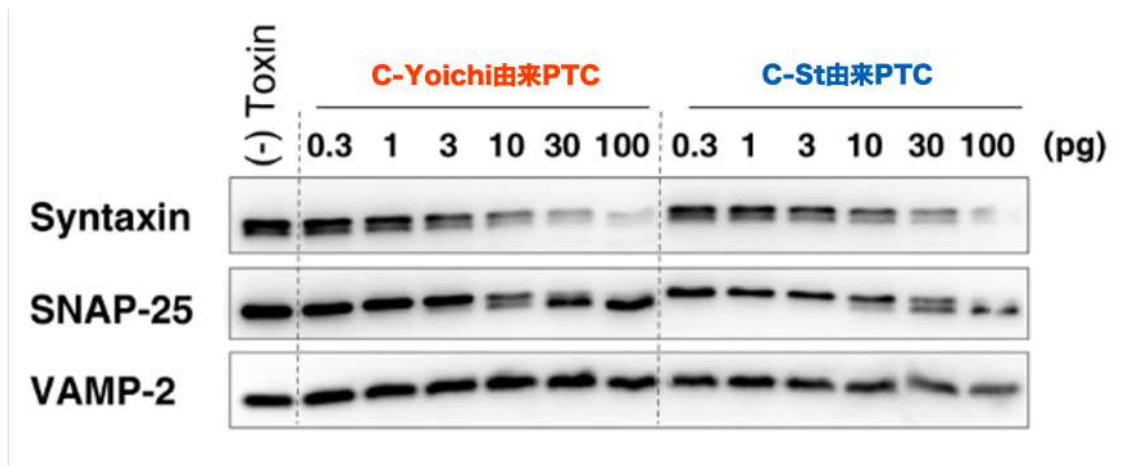


Fig.2 培養細胞 BoNT 活性試験評価

培養神経細胞を C-Yoichi または C-St 由来 PTC に 12 時間暴露し、細胞を溶解して SDS-PAGE に供した。SNARE タンパク質の切断は、western-blot を用いて検出した。VAMP-2 はローディングコントロールとして用いた。

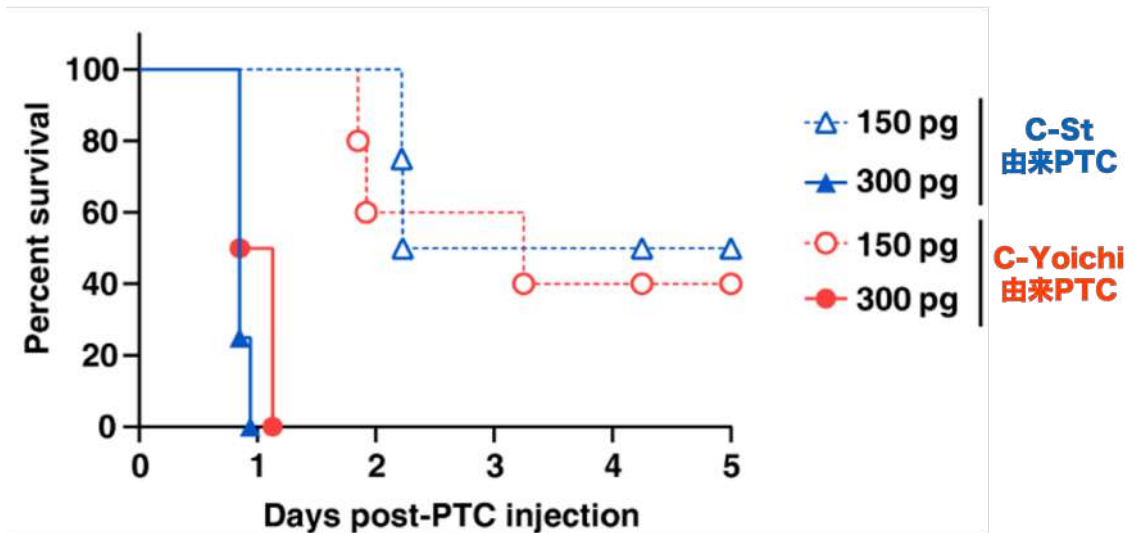


Fig.3 マウス腹腔内投与 BoNT 評価試験

マウスに C-Yoichi または C-St 由来 PTC を腹腔内注射で投与した。マウスは 5 日間観察された ( $n=4-5$ )。統計解析は、log-rank 検定を用いて行った ( $P=0.180$ ; C-St 由来 PTC 150 pg vs. C-Yoichi 由来 PTC 150 pg,  $P=0.708$ ; 300 pg の C-St 由来 PTC vs. 300 pg の C-Yoichi PTC)。

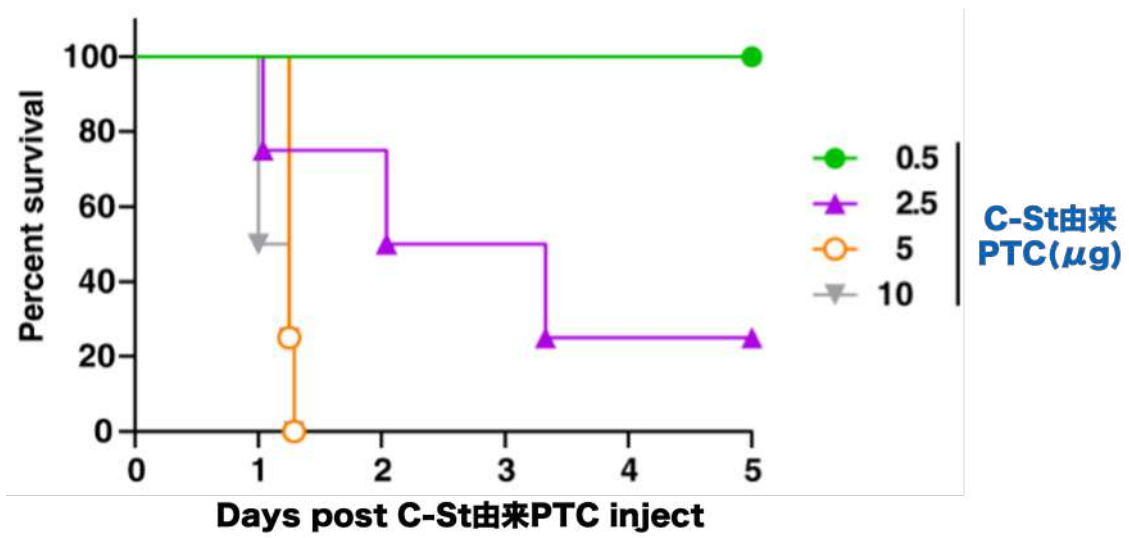


Fig.4 C-St 由来 PTC のマウス経口毒性

精製した C-St 由来 PTC をマウスに経口投与し ( $n = 6$ )、5 日間経過を観察した。(log-rank 検定、\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.1$ )。

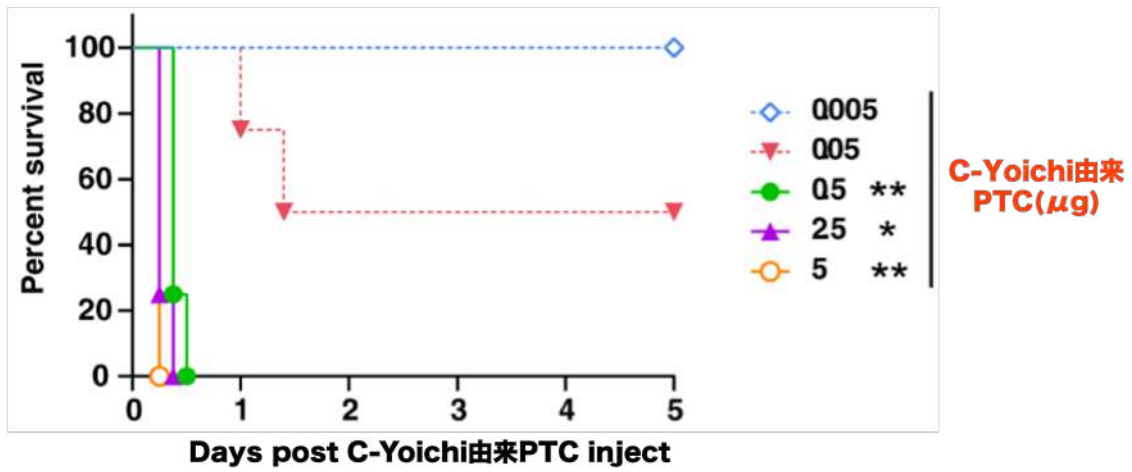


Fig.5 C-Yoichi 由来 PTC のマウス経口毒性試験

C-Yoichi 由来 PTC をマウスに経口投与し ( $n = 6$ )、5 日間経過を観察した。

(log-rank 検定、\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.1$ )。



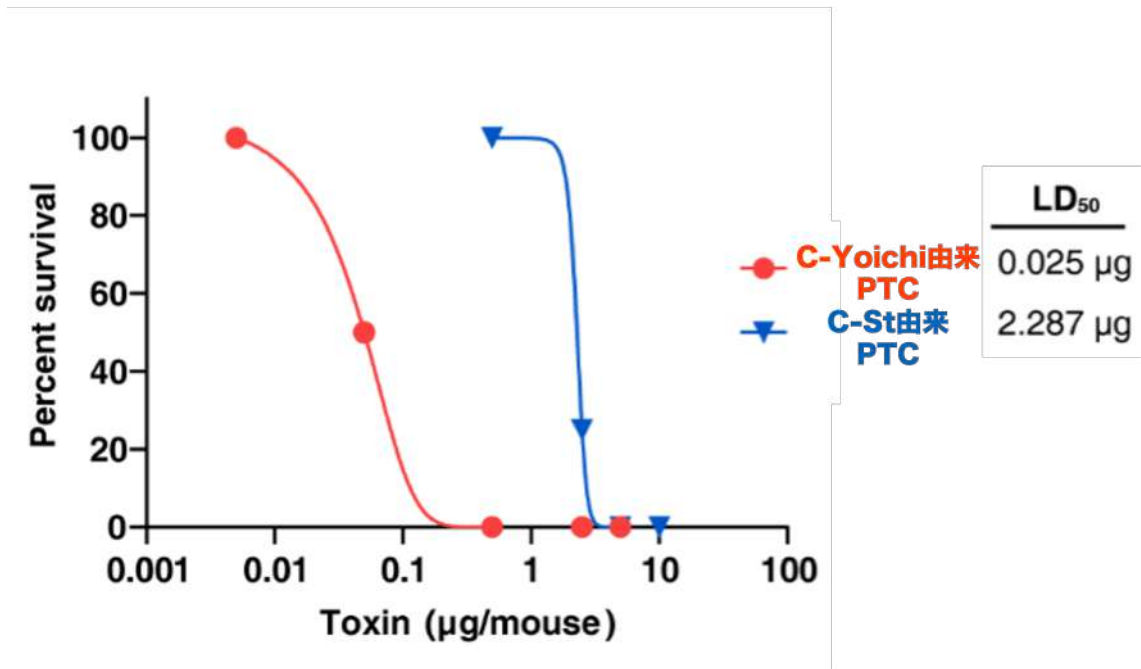


Fig.6 経口毒性用量曲線

C-Yoichi および C-St 由来 PTC の経口毒性を比較するために、様々な濃度について注射後 5 日の生存率をプロットした。

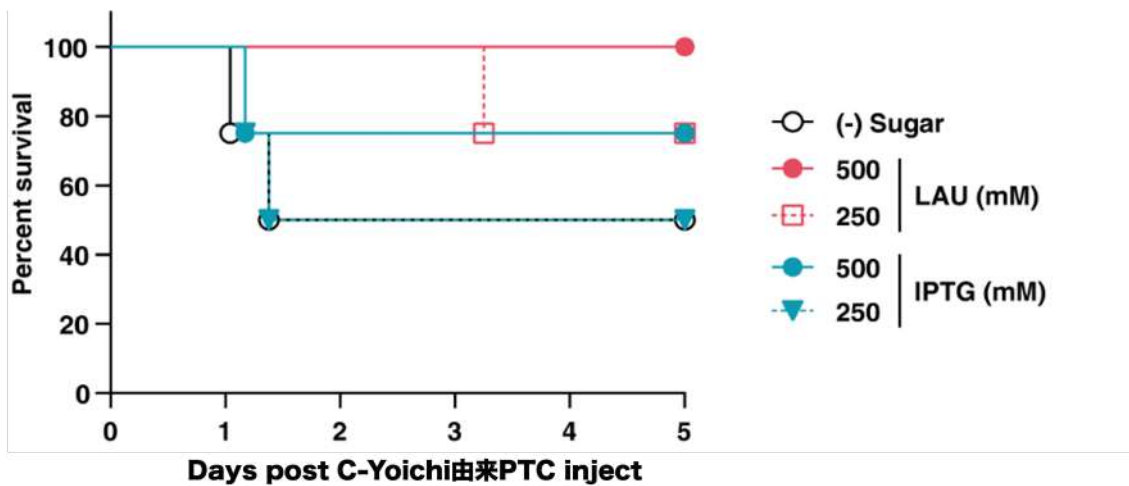


Fig.7 マウス経口毒性糖阻害試験

マウスに C-Yoichi 由来 PTC を 250 および 500 mM の IPTG および LAU の存在下または非存在下で経口投与した。マウスを 5 日間観察した ( $n=4$ )。統計解析は、(-) 糖および log rank 検定を用いて行った ( $P = 0.128$  ; 500 mM LAU、 $P = 0.383$  ; 250 mM LAU、 $P = 0.508$  ; 500 mM IPTG、 $P = 0.940$  ; 250 mM IPTG)。

## 第6章 総括

ボツリヌス菌はボツリヌス神経毒素 (BoNT) を産生する。BoNT は単独では存在せず、非毒非血球凝集素 (NTNHA) および 3 種の血球凝集素 (HA-70、HA-17、HA-33) からボツリヌス毒素複合体 (PTC) を形成する。このボツリヌス毒素複合体の構成タンパク質のうち、BoNT のみが毒素活性を持ち、他のタンパク質は無毒である。経口摂取された PTC は無毒タンパク質により胃での消化をまぬがれ、小腸まで到達する。HA-33 は小腸上皮細胞の結合に最も重要だとされ、毒素の体内への侵入を促進させている。すなわち、HA-33 はボツリヌス食中毒の発症に対し、極めて重要な存在である。C-Yoichi が産生する HA-33 は一般的な C 型 HA-33 とは異なり、C 末端 31 アミノ酸残基が欠落していることがわかっている。しかし、Yoichi PTC の HA-33 に見られる C 末端 31 アミノ酸残基の欠落のメカニズムや経口毒性に与える HA-33 の変異の影響については分かっていない。そこで Yoichi 株が産生する PTC の構造変化と機能性との関連性を明らかにするための研究を行った。

### 1. 組換え体 C-Yoichi HA-33 の作製

C-Yoichi が産生する PTC の HA-33 は C 末端 31 アミノ酸残基が欠落している。本研究では、C 末端 31 アミノ酸残基がどのように欠落するのかを明らかにするために様々な組換え体 HA-33 の作製を試みた。N 末端側、C 末端側のどちら側が切断を受けやすいかを調べるために、C-Yoichi HA-33 の N 末端、C 末端の両端に tag を付与した組換え体 dual-tag HA-33 の作製を試みた。また、HA-33 が HA-17 との複合体形成時に切断を受けにくくなるのかを調べるために組換え体

HA-33/HA-17 複合体の作製を試みた。さらに、C 末端 31 アミノ酸残基が欠落した C-Yoichi HA-33 の構造と機能を調べるために、大量にタンパク質発現が可能な C-Yoichi HA-33 (variant HA-33 : vHA-33) の組換え体の作製をした。本研究では、HA-33 の N 末、C 末の両端に tag を付与した dual-tag HA-33 の作製に成功した。次に HA-33/HA-17 複合体は pETduet1 を用いることで作製が可能となった。C 末端 31 アミノ酸残基が欠落している組換え体 vHA-33 は封入体を形成してしまい、精製が困難であった。そのため、可溶化を促す MBP-tag を vHA-33 の N 末端側に付与し可溶化を試みた結果、可溶化に成功した。しかし、MBP-tag と vHA-33 を TEV Protease による分離を試みたところ、MBP-tag の切断が困難であった。HA-33 の C 末端 31 アミノ酸残基は  $\beta$  シートの形成に重要な部分であり、タンパク質のフォールディング時に凝集してしまうことが考えられる。そのため、vHA-33 は凝集体を形成していた可能性が考えられる。

## 2. 組換え体 HA-33 の切断試験

C-Yoichi が産生する HA-33 は C 末端 31 アミノ酸残基が切断される。しかし、C-Yoichi HA-33 の切断機構は分かっていない。本研究は、ボツリヌス菌培養液を用いて組換え体 HA-33 の切断機序を検討した。NTNHA はインキュベート中に NTNHA の N 末端側が切断され自己消化を起こすことがわかっている。組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 もインキュベート中に自己消化を起こすのかを調べるために、無菌処理した全長型 HA-33 を 37°C でインキュベートした。全長型 HA-33 を無菌条件化でインキュベートしても分子量に変化は見られなかったため、自己消化ではないことが確認できた。C-Yoichi HA-33 C 末端切断の要因をプ

ロテアーゼと考え、C-Yoichi 培養溶液に組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 を混合したところ、SDS-PAGE 上で C-Yoichi 由来 HA-33 と同じ分子量の位置にバンドが現れたため、切断を受けた事が考えられた。次に、C-Yoichi 培養液のみに存在するプロテアーゼなのかを調べるために、C-St 培養液を用いて同様の実験を行った結果、組換え体 C-Yoichi 全長型 HA-33 は切断を受けた。次に、C-Yoichi HA-33 がアミノ酸配列特異的に切断されるかを確認するために、組換え体 C-St HA-33 と C-Yoichi 培養液を混合した所、切断を受けなかった。すなわち、HA-33 の切断は C-Yoichi が特異的に産生するプロテアーゼによるものではないことが考えられ、C-Yoichi HA-33 アミノ酸特異的であることが確認できた。次に、C-Yoichi 菌体にプロテアーゼが含まれているのかを調べるために、C-Yoichi 培養液を遠心分離し、菌体と培養上清に分け、菌体と C-Yoichi 全長型 HA-33 を混合した。菌体と混合することで全長型 HA-33 は切断を受けたため、菌体にプロテアーゼが含まれることが確認できた。また EDTA を菌体に添加すると切断阻害を受けるかを確認した所、切断が阻害されたため、菌体に含まれるプロテアーゼは金属プロテアーゼ様であることが考えられた。

### 3. C-Yoichi および C-St 毒素複合体の細胞結合性

ボツリヌス毒素複合体の構成成分である HA-33 は細胞への結合に最も重要であり、細胞の糖鎖を認識する。C-Yoichi PTC は細胞結合に重要だと考えられる HA-33 の C 末端 31 アミノ酸残基が欠落している。本研究では、特異な C-Yoichi 由来 PTC の細胞結合性および糖認識を調べるため、C-St 由来 PTC と比較を行った。IEC-6 を用いて、C-Yoichi 由来 PTC の結合性を確認したところ、C-St

由来 PTC より結合性が低いことが確認できた。一方、IEC-6 に NDase 処理を行なった所、NDase 濃度依存的に C-Yoichi 由来 PTC の細胞結合性が増加した。しかし、C-St 由来 PTC の結合量に変化はなかった。この結果から、C-Yoichi 由来 PTC は NDase 処理された細胞のガラクトース糖鎖を特異的に認識することが示唆された。次に、NDase 処理済 IEC-6 に Sia、Galactose、Lactulose、IPTG と混合した C-Yoichi 由来 PTC を用いて、細胞糖阻害結合試験を行なった所、ガラクトースを含む糖で細胞結合能が低下することが確認できた。この結果から、C-Yoichi PTC はガラクトース特異的に結合することが明らかとなった。

#### 4. C-Yoichi および C-St 毒素複合体のマウス腹腔および経口毒性

C-Yoichi 由来 PTC は HA-33 の C 末端 31 アミノ酸残基が欠落し、その細胞結合性が通常の C 型 PTC と異なっているが、生体に対する毒性の違いは明らかとなっていない。本研究では、C-Yoichi 由来 PTC と BoNT のアミノ酸配列が 100% 相同の C-St 由来 PTC のマウス毒性を比較した。まず、培養神経細胞を用いて C-Yoichi 由来 PTC および C-St 由来 PTC の BoNT の活性を確認した。C-Yoichi 由来 PTC と C-St 由来 PTC から分離した BoNT では、シンタキシンと SNAP-25 の分解が同程度に観察された。次に、マウスを用いて、C-Yoichi 由来 PTC および C-St 由来 PTC の腹腔内毒性を比較した。腹腔内毒性は同程度であった。これらの結果から C-St と C-Yoichi の BoNT の毒性は同じであることが明らかとなった。マウスに対する経口投与では C-St 由来 PTC は 2.287  $\mu\text{g}$  でマウス半数致死量になり、C-Yoichi 由来 PTC では 0.025  $\mu\text{g}$  で半数致死量になった。すなわち、90 倍毒性に差があった。次に、ガラクトースを含む Lactulose (LAU)、

IPTG を混合した C-Yoichi 由来 PTC のマウス経口毒性糖阻害試験では、マウス経口毒性が弱まることが確認された。4 章でも述べたとおり、C-Yoichi 由来 PTC はガラクトースを特異的に認識する。C-Yoichi 由来 PTC が小腸上皮を介して体内に取り込まれる際には細胞表面糖鎖の Gal 部位に優位に結合していることが考えられる。

本研究では、ボツリヌス C 型菌 Yoichi 株が産生する毒素複合体の特異な翻訳後修飾とその経口毒性に関する研究を行った。まず初めに、第 2 章、第 3 章でボツリヌス C 型菌 Yoichi 株の産生する毒素複合体の構成成分である HA-33 の発現や、その特異的な C 末端の欠落機構の要因を明らかにした。第 4 章では C-Yoichi 由来 PTC の細胞結合性を C-St 由来 PTC と比較し、結合能が低いことを明らかにした。しかし、NDase 処理済細胞を用いると NDase 濃度依存的に結合能が上昇し、糖阻害試験ではガラクトース含有糖で阻害されることを明らかにした。さらに、第 5 章では C-Yoichi 由来 PTC および C-St 由来 PTC を培養神経細胞あるいはマウス腹腔内注射によって BoNT の活性を決定した所、同程度であった。これらの事柄を踏まえ、C-Yoichi 由来 PTC および C-St 由来 PTC をマウス経口投与した所、C-Yoichi 由来 PTC のマウス経口毒性が C-St 由来 PTC と比べ約 90 倍もの毒性があることを明らかにし、C-Yoichi 由来 PTC はガラクトースを含む難消化性の糖類でマウス経口毒性が弱まることが明らかになった。

## 第7章 結言

本研究によって、C-Yoichi 由来 PTC はガラクトース糖を認識する事がわかり、HA-33 が経口毒性に関与している事が確認できた。この C-Yoichi 由来 PTC の胃酸・プロテアーゼ耐性や細胞糖鎖特異性を利用し、機能性タンパク質の薬剤運搬システムを開発することができるかもしれない。近年のがん治療では細胞表面の受容体を標的とする単一特異性抗体による治療がある。しかし、がん細胞に到達するまでの経路により単一特異性抗体の治療の有効性が制限される可能性がある (Zhu, Y., et al., 2015)。近年、細胞の糖鎖を標的にする薬剤運搬が研究されているが (Shimomura, O., et al., 2018)、これは主として静脈注射を念頭に置いている。一方、PTC HA-33 は胃酸・プロテアーゼ耐性を有しているため経口摂取が可能な薬剤の運搬体として利用できるかもしれない。また、がん細胞の表面はシアリル化、フコシル化、O-グリカン切断、N-結合型およびO-結合型グリカン分岐などのグリコシル化を伴うことが知られており、ガラクトースに強く認識する HA はがん細胞を標的にできる可能性がある (Pinho, S. S., & Reis, C. A., 2015) (Christiansen, M. N., et al., 2014) (Reticker-Flynn, N. E., & Bhatia, S. N., 2015)。ボツリヌス神経毒素は神経麻痺を応用した医療や美容目的での利用・開発 (Erbguth, F. J., & Naumann, M., 1999) (Binder, W. J., et al., 2000) (Satriyasa, B. K., 2019) が進む一方、無毒タンパク質の機能を利用した開発は進んでいない。本研究はボツリヌス無毒タンパク質が様々な疾患を治療する経口投与薬剤運搬ツールとして利用される可能性を強く示したものである。



## 引用文献

- Barash, J. R., & Arnon, S. S. (2014). A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *The Journal of infectious diseases*, 209(2), 183-191.
- Barr, J. R., Moura, H., Boyer, A. E., Woolfitt, A. R., Kalb, S. R., Pavlopoulos, A., ... & Ashley, D. L. (2005). Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Emerging infectious diseases*, 11(10), 1578.
- Binder, W. J., Brin, M. F., Blitzer, A., Schoenrock, L. D., & Pogoda, J. M. (2000). Botulinum toxin type A (BOTOX) for treatment of migraine headaches: an open-label study. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 123(6), 669-676.
- National Center for Infectious Diseases (U.S.), Division of Bacterial and Mycotic Diseases. (1998). Botulism in the United States, 1899–1996. *Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers*, 1998.
- Christiansen, M. N., Chik, J., Lee, L., Anugraham, M., Abrahams, J. L., & Packer, N. H. (2014). Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*, 14(4-5), 525-546.
- Dover, N., Barash, J. R., Hill, K. K., Xie, G., & Arnon, S. S. (2014). Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *The Journal of infectious diseases*, 209(2), 192-202.
- Dressler, D., & Saberi, F. A. (2005). Botulinum toxin: mechanisms of action. *European neurology*, 53(1), 3-9.
- Erbguth, F. J., & Naumann, M. (1999). Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786–1862) and the “sausage poison”. *Neurology*, 53(8), 1850-1850.

- Felber, E. S. (2006). Botulinum toxin in primary care medicine. *Journal of Osteopathic Medicine*, 106(10), 609-614.
- Fox, J. D., & Waugh, D. S. (2003). Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *E. coli Gene Expression Protocols*, 99-117.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, J. C., Popoff, M. R., ... & Oguma, K. (2000). Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS letters*, 467(2-3), 179-183.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Shimazaki, S., Tomochika, K., Tsuzuki, K., Fujii, N., ... & Oguma, K. (1994). Molecular construction of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin and its gene organization. *Biochemical and biophysical research communications*, 205(2), 1291-1298.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E., & Oguma, K. (1997). 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*, 143(12), 3841-3847.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watarai, S., Sakaguchi, Y., Arimitsu, H., Lee, J. C., ... & Oguma, K. (2004). Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology*, 150(5), 1529-1538.
- Gimenez, D., & Ciccarelli, A. S. (1970). Another type of *Clostridium*

*botulinum*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. I (Originale)*, 215(2), 221-4.

- Burke, G. S. (1919). Notes on *Bacillus botulinus*. *Journal of bacteriology*, 4(5), 555-570.
- Gunnison, J. B., & Meyer, K. F. (1929). South African cultures of *Clostridium botulinum* and *Cl. paratbotulinum* with a description of *Cl. botulinum* type D, N. SP. *The Journal of Infectious Diseases*, 45, 106-18.
- Gunnison, J. B., Cummings, J. R., & Meyer, K. F. (1936). *Clostridium botulinum* type E. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 35(2), 278-280.
- Hasegawa, K., Watanabe, T., Suzuki, T., Yamano, A., Oikawa, T., Sato, Y., ... & Ohya, T. (2007). A novel subunit structure of *Clostridium botulinum* serotype D toxin complex with three extended arms. *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), 24777-24783.
- Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clinical microbiology reviews*, 3(1), 66-98.
- Hatrup, C. L., & Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 431-457.
- Hayashi, S., Akiyama, T., Sagane, Y., Miyashita, S. I., Watanabe, T., Yajima, S., & Niwa, K. (2014). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel haemagglutinin component of the toxin complex of serotype C *Clostridium botulinum*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology*

*Communications*, 70(3), 370-373.

- Hazen, E. L. (1937). A strain of *B. botulinus* not classified as type A, B, or C. *The Journal of Infectious Diseases*, 260-264.
- Bengtson, I. A. (1922). Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia caesar*. *Public Health Reports (1896-1970)*, 164-170.
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Honke, K., Arimitsu, H., Mahmut, N., Sakaguchi, Y., ... & Oguma, K. (2001). *Clostridium botulinum* type A haemagglutinin-positive progenitor toxin (HA<sup>+</sup>-PTX) binds to oligosaccharides containing Gal $\beta$ 1-4GlcNAc through one subcomponent of haemagglutinin (HA1). *Microbiology*, 147(4), 811-819.
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Honke, K., Yokota, K., Ikeda, T., Ohyama, T., ... & Oguma, K. (1999). Characterization of haemagglutinin activity of *Clostridium botulinum* type C and D 16S toxins, and one subcomponent of haemagglutinin (HA1). *Microbiology*, 145(9), 2533-2542.
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K., Moriishi, K., ... & Oguma, K. (1996). Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infection and Immunity*, 64(5), 1589-1594.
- Ito, H., Sagane, Y., Miyata, K., Inui, K., Matsuo, T., Horiuchi, R., ... & Watanabe, T. (2011). HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 61(3), 323-331.
- Jahn, R., & Niemann, H. (1994). Molecular mechanisms of clostridial neurotoxins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 733(1), 245-255.

- Jin, Y., Takegahara, Y., Sugawara, Y., Matsumura, T., & Fujinaga, Y. (2009). 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*(1), 35-45.
- Kalb, S. R., Baudys, J., & Barr, J. R. (2015). Detection of the HA-33 protein in botulinum neurotoxin type G complex by mass spectrometry. *BMC microbiology*, *15*, 1-5.
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*, *12*, 319-330.
- Kimura, K., Fujii, N., Tsuzuki, K., Murakami, T., Indoh, T., Yokosawa, N., ... & Oguma, K. (1990). The complete nucleotide sequence of the gene coding for botulinum type C1 toxin in the C-ST phage genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *171*(3), 1304-1311.
- Kouguchi, H., Watanabe, T., Sagane, Y., & Ohyama, T. (2001). Characterization and reconstitution of functional hemagglutinin of the *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin. *European Journal of Biochemistry*, *268*(14), 4019-4026.
- Kouguchi, H., Watanabe, T., Sagane, Y., Sunagawa, H., & Ohyama, T. (2002). In vitro reconstitution of the *Clostridium botulinum* type D progenitor toxin. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(4), 2650-2656.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, *227*(5259), 680-685.
- Lee, K., Gu, S., Jin, L., Le, T. T. N., Cheng, L. W., Strotmeier, J., ... & Jin, R. (2013).

Structure of a bimodular botulinum neurotoxin complex provides insights into its oral toxicity. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003690.

- Lee, K., Lam, K. H., Krueel, A. M., Mahrhold, S., Perry, K., Cheng, L. W., ... & Jin, R. (2015). Inhibiting oral intoxication of botulinum neurotoxin A complex by carbohydrate receptor mimics. *Toxicon*, 107, 43-49.
- Lee, K., Zhong, X., Gu, S., Krueel, A. M., Dorner, M. B., Perry, K., ... & Jin, R. (2014). Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex. *Science*, 344(6190), 1405-1410.
- Li, B., Peet, N. P., Butler, M. M., Burnett, J. C., Moir, D. T., & Bowlin, T. L. (2010). Small molecule inhibitors as countermeasures for botulinum neurotoxin intoxication. *Molecules*, 16(1), 202-220.
- Maslanka, S. E., Lúquez, C., Dykes, J. K., Tepp, W. H., Pier, C. L., Pellett, S., ... & Johnson, E. A. (2016). A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. *The Journal of infectious diseases*, 213(3), 379-385.
- Matsumura, T., Jin, Y., Kabumoto, Y., Takegahara, Y., Oguma, K., Lencer, W. I., & Fujinaga, Y. (2008). The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cellular microbiology*, 10(2), 355-364.
- Matsuo, T., Miyata, K., Inui, K., Ito, H., Horiuchi, R., Suzuki, T., ... & Ohyama, T. (2011). Characterization of sugar recognition by the toxin complex produced by the

*Clostridium botulinum* serotype C variant strain Yoichi. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 63(1), 35-43.

- Melling, J., Hambleton, P., & Shone, C. C. (1988). *Clostridium botulinum* toxins: nature and preparation for clinical use. *Eye*, 2(1), 16-23.
- Miyata, K., Suzuki, T., Hayashi, S., Miyashita, S. I., Ohyama, T., Niwa, K., ... & Sagane, Y. (2015). Hemagglutinin gene shuffling among *Clostridium botulinum* serotypes C and D yields distinct sugar recognition of the botulinum toxin complex. *Pathogens and Disease*, 73(7).
- Moller, V., & Scheibel, I. (1960). Preliminary report on the isolation of an apparently new type of CI. botulinum. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 48, 80.
- Montecucco, C., & Molgó, J. (2005). Botulinal neurotoxins: revival of an old killer. *Current opinion in pharmacology*, 5(3), 274-279.
- Mutoh, S., Suzuki, T., Hasegawa, K., Nakazawa, Y., Kouguchi, H., Sagane, Y., ... & Ohyama, T. (2005). Four molecules of the 33 kDa haemagglutinin component of the *Clostridium botulinum* serotype C and D toxin complexes are required to aggregate erythrocytes. *Microbiology*, 151(12), 3847-3858.
- Nakajima, H., Inoue, K., Ikeda, T., Fujinaga, Y., Sunagawa, H., Takeshi, K., ... & Oguma, K. (1998). Molecular composition of the 16S toxin produced by a *Clostridium botulinum* type D strain, 1873. *Microbiology and immunology*, 42(9), 599-605.
- Nakamura, T., Takada, N., Tonozuka, T., Sakano, Y., Oguma, K., & Nishikawa, A. (2007). Binding properties of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin to

- mucins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(4), 551-555.
- Nakamura, T., Tonozuka, T., Ide, A., Yuzawa, T., Oguma, K., & Nishikawa, A. (2008). Sugar-binding sites of the HA1 subcomponent of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin. *Journal of molecular biology*, 376(3), 854-867.
  - Nakamura, T., Tonozuka, T., Ito, S., Takeda, Y., Sato, R., Matsuo, I., ... & Nishikawa, A. (2011). Molecular diversity of the two sugar-binding sites of the  $\beta$ -trefoil lectin HA33/C (HA1) from *Clostridium botulinum* type C neurotoxin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 512(1), 69-77.
  - Nigam, P. K., & Nigam, A. (2010). Botulinum toxin. *Indian journal of dermatology*, 55(1), 8.
  - Nishikawa, A., Uotsu, N., Arimitsu, H., Lee, J. C., Miura, Y., Fujinaga, Y., ... & Oguma, K. (2004). The receptor and transporter for internalization of ty *Clostridium botulinum* pe C progenitor toxin into HT-29 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(2), 327-333.
  - Oguma, K., Iida, H., & Shiozaki, M. (1976). Phage conversion to hemagglutinin production in *Clostridium botulinum* types C and D. *Infection and Immunity*, 14(3), 597-602.
  - Oguma, K., Inoue, K., Fujinaga, Y., Yokota, K., Watanabe, T., Ohyama, T., ... & Inoue, K. (1999). Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 18(1), 17-34.
  - Oguma, K., Syuto, B., Kubo, S., & Iida H. (1985). Analysis of antigenic structure of *Clostridium botulinum* type C1 and D toxins by monoclonal antibodies.



In *Monoclonal antibodies against bacteria* (pp. 159-184). Academic Press.

- Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 540-555.
- Reticker-Flynn, N. E., & Bhatia, S. N. (2015). Aberrant Glycosylation Promotes Lung Cancer Metastasis through Adhesion to Galectins in the Metastatic Niche. *St6galnac4, Gcnt3, and Galectins as Drivers of Metastasis. Cancer discovery*, 5(2), 168-181.
- Rossetto, O., Pirazzini, M., & Montecucco, C. (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 12(8), 535-549.
- Sagane, Y., Kouguchi, H., Watanabe, T., Sunagawa, H., Inoue, K., Fujinaga, Y., ... & Ohyama, T. (2001). Role of C-terminal region of HA-33 component of botulinum toxin in hemagglutination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(3), 650-657.
- Sagane, Y., Mutoh, S., Koizumi, R., Suzuki, T., Miyashita, S., Miyata, K., Ohyama, T., Niwa, K., & Watanabe, T. (2017). Reversible association of the hemagglutinin subcomplex, HA-33/HA-17 trimer, with the botulinum toxin complex. *Protein J*, 36(5), 417-424.
- Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., ... & Oguma, K. (2005). The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(48), 17472-17477.

- Satriyasa, B. K. (2019). Botulinum toxin (Botox) A for reducing the appearance of facial wrinkles: a literature review of clinical use and pharmacological aspect. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 223-228.
- Shimomura, O., Oda, T., Tateno, H., Ozawa, Y., Kimura, S., Sakashita, S., ... & Ohkohchi, N. (2018). A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting cell surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin–Drug Conjugate (LDC) rBC2LC-N Lectin–Drug Conjugate (LDC) for Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(1), 183-195.
- Sonnabend, O. A., Sonnabend, W., Heinzle, R., Sigrist, T., Dirnhofer, R., & Krech, U. (1981). Isolation of *Clostridium botulinum* type G and identification of type G botulinum toxin in humans: report of five sudden unexpected deaths. *Journal of Infectious Diseases*, 143(1), 22-27.
- Sugawara, Y., Matsumura, T., Takegahara, Y., Jin, Y., Tsukasaki, Y., Takeichi, M., & Fujinaga, Y. (2010). Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *Journal of Cell Biology*, 189(4), 691-700.
- Sugii, Shunji., & Sakaguchi, Genji. (1975). Molecular construction of *Clostridium botulinum* type A toxins. *Infection and Immunity*, 12(6), 1262-1270.
- Suzuki, T., Yoneyama, T., Miyata, K., Mikami, A., Chikai, T., Inui, K., ... & Ohyama, T. (2009). Molecular characterization of the protease from *Clostridium botulinum* serotype C responsible for nicking in botulinum neurotoxin complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 309-313.
- Suzuki, T., Watanabe, T., Mutoh, S., Hasegawa, K., Kouguchi, H., Sagane, Y.,

- Fujinaga, Y., Oguma, K., & Ohyama, T. Characterization of the interaction between subunits of botulinum toxin complex produced by serotype D through tryptic susceptibility of the isolated components and complex forms. (2005). *Microbiology* 151, 1475-1483.
- Syuto, B., & Kubo, S. (1972). Purification and crystallization of *Clostridium botulinum* type C toxin. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 20(1-2), 19-30.
  - Tsuzuki, Kayo., Kimura, Kouichi., Fujii, Nobuhiro., Yokosawa, Noriko., Indoh, Tomokazu., Murakami, T., & Oguma, K. (1990). Cloning and complete nucleotide sequence of the gene for the main component of hemagglutinin produced by *Clostridium botulinum* type C. *Infection and immunity*, 58(10), 3173-3177.
  - Uotsu, N., Nishikawa, A., Watanabe, T., Ohyama, T., Tonozuka, T., Sakano, Y., & Oguma, K. (2006). Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(1), 120-128.
  - Ermengem, E.V. (1897). Ueber einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 26, 1-56.
  - Winslow, C. E., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede Jr, C., Rogers, L. A., & Smith, G. H. (1917). The families and genera of the bacteria preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of bacteriology*, 2(5), 505-566.
  - Yao, G., Lee, K., Gu, S., Lam, K. H., & Jin, R. (2014). Botulinum neurotoxin A

complex recognizes host carbohydrates through its hemagglutinin component. *Toxins*, 6(2), 624-635.

- Zhang, S., Masuyer, G., Zhang, J., Shen, Y., Lundin, D., Henriksson, L., ... & Stenmark, P. (2017). Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nature communications*, 8(1), 14130.
- Zhu, Y., Choi, S. H., & Shah, K. (2015). Multifunctional receptor-targeting antibodies for cancer therapy. *The Lancet Oncology*, 16(15), e543-e554.
- 芦田久. (2016). 消化管ムチンを介した微生物と宿主の相互作用. *化学と生物*, 54(12), 901-908.
- 伊藤武. (1976). 北海道のミンク養殖場で発生したボツリヌス C 型菌による中毒斃死例について. *麻布獣医科大学研究報告*, 1(2), p29-35.
- 金英姫. (2007). 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. *岡山医学会雑誌*, 119(2), 147-151.
- 大山徹. (2006). ボツリヌス毒素の機能とそのサブユニット構造. *蛋白質核酸酵素*, 51(15), 2334-2340.

## 謝辞

本研究を遂行および本論文の作成にあたり、終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました東京農業大学教授、相根義昌博士、東京農業大学助教、宮下慎一郎博士に深甚なる感謝の意を捧げます。

また、ご助言、ご鞭撻を賜りました東京農業大学教授、丹羽光一博士、中澤洋三博士、南和広博士に衷心より謝意を表します。

さらに、中学生の時から手をかけてくださり、東京農業大学大学院への進学を勧めていただいた、東京農業大学名誉教授、渡部俊弘博士、本論文の作成にあたり終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました東京農業大学名誉教授、桃木芳枝博士に厚く御礼申し上げます。

共に研究活動を行った、細谷圭汰さん、黄インシュンさん、畑剛士さん、阿部颯さん、小河原実咲さん、下山渉さん、瀬口悠希さん、堤千江子さん、渡邊紗英さん、植村ほなみさん、中山花菜さん、川又志織さんに感謝いたします。

最後に、あたたかい励ましをいつも送り続けてくれた家族に心から感謝いたします。

## Abstract

Botulinum toxin complex (PTC) is a 750 kDa protein produced by botulinum; PTC is a complex of BoNT and NTNHA, bound to three hemagglutinin (HA-70, HA-33 and HA-17). When PTC is ingested orally, the non-toxic protein protects BoNT from acids and proteases and facilitates its absorption from the small intestine; PTC recognizes sugar chains on the surface of epithelial cells, resulting in uptake from the small intestine and botulism. In this process, HA-33 of PTC functions as an adhesion molecule, and Sagane et al. found that the C-terminal 31 residues of HA-33, a component of C-Yoichi L-PTC, were deleted after translation from the results of C-terminal amino acid sequence analysis [Sagane, 2001]. On the other hand, analysis of the gene sequence encoding C-Yoichi HA-33 revealed a mutation of 76 of 140 amino acid residues in the C-terminal region of HA-33, indicating that C-Yoichi HA-33 is 40.8% homologous to other serotype C and D HA-33 in the C-terminal domain of the primary structure [Sagane, 2001]. In addition, Matsuo et al. suggested that C-Yoichi L-PTC exhibited high HA activity and binding activity to neuraminidase (NDase)-treated blood cells. Furthermore, the presence of Galactose (Gal) or Lactose (Lac) in the blood cells completely inhibited hyaluronan activity and binding activity. Thus, it was reported that C-Yoichi L-PTC recognizes Gal, unlike other serotype C L-PTCs [Matsuo, 2011]. These previous studies revealed that L-PTCs from C-Yoichi strain have specific cell-binding properties compared to other serotype C L-PTCs. However, compared to other serotype C HA-33 proteins, the primary structure of C-Yoichi HA-33 is altered by two factors, genetic mutation and post-translational modification, and the relationship

between these factors and cell binding remains unclear. Therefore, the author focused on the structure and function of C-Yoichi HA-33 with the aim of characterizing the structure and functionality of HA-33.

Chapter 1 of this dissertation describes the study of botulinum and the toxin protein, and Chapter 2 describes the preparation of recombinant HA-33. Chapter 3 attempts to determine whether recombinant HA-33 undergoes cleavage by supernatant components of serotype C cultures, and Chapter 4 discusses the differences in cell-binding properties of C-Yoichi and C-Stockholm L-PTC. In Chapter 5, we examined the oral toxicity of C-Yoichi and C-Stockholm L-PTC in mice.

## Chapter 2: Construction of Recombinant C-Yoichi HA-33

In this chapter, we aimed to construct various recombinant C-Yoichi HA-33. First, we attempted to create vHA-33 lacking the C-terminal 31 amino acid residues. However, Western blotting results showed that a band of recombinant vHA-33 was detected in *E. coli* precipitates after sonication, confirming that it formed an inclusion body. In order to attempt solubilization of vHA-33, MBP-tag vHA-33 was prepared by adding MBP-tag, which promotes solubilization, to the N-terminal side of vHA-33. Next, it is unclear whether the deletion of HA-33 by protease occurs from the N-terminal side or the C-terminal side. Therefore, we constructed a dual-tag HA-33 expression system with tags at both ends of the N- and C-termini. As a result, we established a purification method for highly purified dual-tag HA-33 protein. Next, HA-33 produced from C-Yoichi is bound to HA-17 in a HA-33/HA-17 complex, and we attempted to generate HA-33/HA-

17 to see whether HA-17 bound to the N-terminal side of HA-33 is resistant to cleavage. As a result, highly purified HA-33/HA-17 complex protein was purified and a purification method was successfully established.

### Chapter 3: Cutting Test of Recombinant C-Yoichi HA-33

We attempted to elucidate the deletion mechanism of vHA-33 produced by C. botulinum serotype C strain Yoichi, and found that C-Yoichi full-length HA-33 was not cleaved under aseptic conditions at 37°C incubation, indicating that it was not autodigested. The full-length HA-33 was mixed with C-Yoichi culture medium, and it was found to be cleaved and transformed into vHA-33. Furthermore, when full-length HA-33 was mixed with C-St culture medium, it was found to be cleaved and transformed into vHA-33. This suggests that HA-33 is cleaved by protease contained in botulinum culture medium. When the HA-33 was mixed with EDTA-2Na, C-Yoichi, and full-length HA-33, the HA-33 was not cleaved, indicating that the C-Yoichi protease was not responsible for the cleavage. protease was considered to be a metalloprotease-like enzyme.



#### Chapter 4: Cell Binding Properties of C-Yoichi and C-St Toxin Complexes

C-Yoichi HA-33 lacks the C-terminal 31 amino acid residues and has an altered structure.

To confirm the function of C-Yoichi HA-33 lacking the C-terminal 31 amino acid residues, the cell-binding properties of C-Yoichi- and C-St-derived PTCs were examined in this study. The cell-binding ability of C-Yoichi-derived PTC was lower than that of C-St-derived PTC. However, the binding ability of C-Yoichi PTC to IEC-6 cells treated with NDase, which cleaves the sialic acid sugar chain ends of the cells and changes the sugar chain ends to galactose, increased in an NDase concentration-dependent manner. This suggests that C-Yoichi PTC specifically recognizes cellular Gal sugar chains. In the cellular sugar inhibition binding test, pretreatment of C-Yoichi HA-33 with Sia did not change its cell-binding ability, but reaction with Gal-containing sugars (LAU, IPTG) decreased the cell-binding ability. This study demonstrates that C-Yoichi derived PTC exhibits strong binding to the galactose sugar chains of cells.

#### Chapter 5: Intraperitoneal and Oral Toxicity of C-Yoichi and C-St Toxin Complexes in Mice

BoNT, the causative agent of food poisoning, is produced by the anaerobic bacterium *Clostridium botulinum*. In the culture medium, BoNT associates with a complex of NTNHA and HA proteins to form the toxin complex (PTC). the HA complex consists of three HA-70 proteins and a three-armed structure of the HA-33/HA-17 complex consisting of two HA-33 and one HA-17. the PTC is Since PTC exhibits higher oral

toxicity than pure BoNT, a non-toxic protein is considered important for food poisoning. C-Yoichi produces PTC with many amino acid substitutions in the C-terminal region of HA-33. In the present study, we found that the intraperitoneal toxicity of PTC from C-Yoichi is almost the same as that from C-St, a common serotype C, but the oral toxicity in mice is about 90-fold higher. Gal. Co-administration of Gal-containing sugars with C-Yoichi derived PTC reduced oral toxicity in mice. This suggests that C-Yoichi PTC binds predominantly to the Gal moiety of cell surface sugar chains when it is taken up by the body via the small intestinal epithelium.

Our study showed that C-Yoichi PTC recognizes galactose sugars, confirming that HA-33 is involved in oral toxicity. The author believes that this study will greatly increase the use and application of non-toxic proteins as oral drug delivery tools for the treatment of various diseases.