

# 細菌毒素の宿主内輸送の分子機構

研究課題名：細菌毒素の宿主細胞内輸送機構の解明と新規治療法開発の試み

藤永 由佳子

大阪大学微生物病研究所 附属感染症国際研究センター 特任助教授

## はじめに

多くの細菌毒素は微量で宿主細胞の機能分子に特異的作用を及ぼし、結果的に宿主に致死など大きな影響を与える。ではどのようにして細菌毒素はこのように強力な作用を発揮できるのか？ その理由の一つとして一般的に考えられているのは、多くの細菌毒素が微量でも宿主の機能に影響を与えることができる酵素であるということである。ここでもう一つ忘れてならない細菌毒素の特質として、作用する基質に効率よくターゲティングする機構すなわち巧みな輸送機構をもつ場合が多いことが挙げられる。その輸送機構は、もともと細胞が基本的・生理的にもっている膜輸送系やオルガネラの機能をうまく利用している場合が多いと考えられる。従って細菌毒素の輸送経路の研究は、毒素による病態発現機構の解明という意義に加えて、従来知られていなかった宿主細胞の基本的で重要なしくみを明らかにできる可能性も秘めている。いずれにしてもこのような研究は外来病原因子の侵入に対する宿主の防御システムを理解し制御する上で重要である。

このような魅力に惹かれて、我々は毒素の輸送機構の研究を行っている。我々は腸管上皮細胞を場として研究を展開しているが、この細胞は多くの細菌毒素がその毒性を発揮するための標的となり、あるいは宿主動物へ侵入する際の門戸となっている。本報告会では、前者の例として腸管上皮細胞に作用して細胞内 cAMP を上昇させるコレラ毒素、後者の例として腸管上皮細胞バリアを通過してボツリヌス食中毒を引き起こすボツリヌス神経毒素複合体の輸送経路についての我々の研究成果を報告する。

## 研究結果と考察

### 1) コレラ毒素の腸管上皮細胞内輸送経路の解明

コレラ毒素は、小腸上皮細胞の apical 側から取り込まれ、細胞質中の Gs タンパク質を ADP-リボシル化することにより cAMP の上昇を引き起こし、下痢を起こすことはよく知られているが、腸管上皮細胞内でどのように輸送されて Gs に到達するのかは不明であった。我々は、コレラ毒素の sulfation によりゴルジ体への移行と、glycosylation により小胞体への移行を検出することで、コレラ毒素の輸送経路を明らかにすることに成功した(図1)。毒素はホロ毒素の状態では細胞膜から小胞体まで輸送されること、そしてその輸送は B サブユニットが主体となり、B サブユニットが脂質ラフト中の GM1 に結合することで行われていることが明らかになった。一方、脂質ラフトに存在していない糖脂質は毒素をゴルジ体や小胞体まで輸送しない。

コレラ毒素以外の毒素やウイルスでその病原性を発揮するために小胞体へ輸送されるものがいくつかある。最近その多くがガングリオシドに結合して小胞体へ輸送されることがわかってきた。したがって本経路は多くの病原因子が細胞質に到達しその病原性を発揮するために利用する共通の経路であることが明らかになってきた。(本研究の一部をさきがけ事業で行った。)

### 2) ボツリヌス毒素複合体の腸管上皮バリア通過機構の解析

ボツリヌス食中毒は、ボツリヌス神経毒素(7S 毒素、約 150 kDa のタンパク質、A 型～G 型)により引き起こされる(図2)。本神経毒素はメタロエンドペプチダーゼであり、末梢神経細胞に取り込まれた場合シナプス小胞とシナプス前膜の fusion に関わる SNARE を特異的に切断することにより神経伝達物質の放出を抑制する。個体(ヒトあるいは動物)においては、末梢運動神経の弛緩性麻痺を引き起こし呼吸困難による致死をもたらす。本食中毒発症には、神経毒素が消化管から吸収され、血中に移行し末梢運動神経に到達することが必要である。このような巨大分子である神経毒素が体内に侵入する際の最初の重要な関門は消化管上皮細胞のバリア機能である。一方、本毒素は常に無毒成分との複合体(12S 毒素および 16S 毒素など)として *C. botulinum* が産生する。12S 毒素は 7S 毒素に無毒性で赤血球凝集

活性のないタンパク質であるNTNHが結合したものであり、16S毒素は12S毒素に無毒性で赤血球凝集活性をもつ Hemagglutinin (HA) が結合したものである。19S毒素は16S毒素の二量体である。それらの経口毒性は7S毒素 < 12S毒素 < 16S毒素と、大きい分子量の複合体毒素の方が著しく強いことが知られているが、その理由については、無毒成分に神経毒素を消化液から保護する作用があること以外は不明であった。

我々は16S毒素がHAを介して小腸上皮細胞に特異的に結合することを見出した。HAは異なる4つのサブユニットから構成されているが、HA1とHA3bに腸管上皮細胞への結合活性がありそれぞれが異なる糖鎖を認識することを明らかにした。さらに *in vitro* 腸管上皮細胞バリアモデルで、HAが神経毒素のapicalからbasolateralへの移行を著しく促進することを見出した。このバリア通過機構についての研究の現状を報告したい。

図1 コレラ毒素の細胞内輸送経路の解析

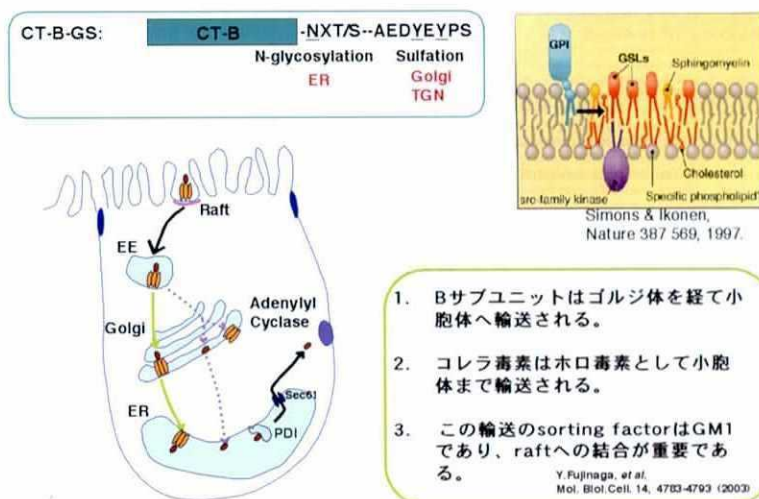
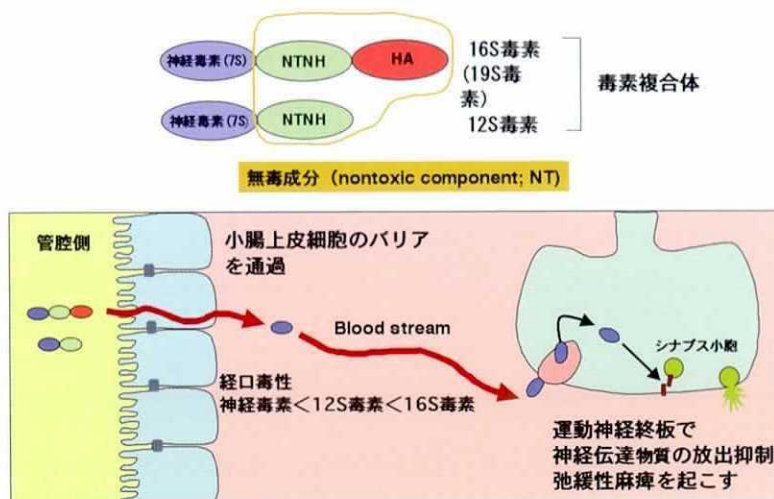


図2 ボツリヌス毒素複合体とボツリヌス食中毒



---

## 今後の展望

我々は腸管上皮細胞を場として外来病原因子である細菌毒素の輸送経路について研究を行っている。腸管上皮細胞は、外界から栄養物を摂取する場所であると同時に、毒素や微生物の侵入の門戸でもある。生物が多細胞生物となったときから宿主と病原体との攻防が宿主腸管上皮細胞で繰り広げられて、お互いが進化してきたということが、本研究を通して垣間見えてきた。ボツリヌス毒素やコレラ毒素が腸管上皮細胞で示す挙動を見つめることにより、お互いのもつ巧妙な仕組みを明らかにしていきたい。

---

## 主要論文リスト

1. Fujinaga Y, Wolf AA, Rodighiero C, Wheeler H, Tsai B, Allen L, Jobling M, Rapoport T, Holmes RK, Lencer WI. Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to ER. *Molecular Biology of the Cell*. 14(12): 4783-93 (2003).
2. Fujinaga Y, Inoue K, Watarai S, Sakaguchi Y, Arimitsu H, Lee J, Jin Y, Matsumura T, Kabumoto Y, Watanabe T, Ohyama T, Nishikawa A, Oguma K. Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology* 150(Pt 5):1529-1538 (2004).
3. Nishikawa A, Uotsu N, Miura Y, Fujinaga Y, Nakada H, Ohyama T, Sakano Y, Oguma K. The receptor and transporter for internalization of *Clostridium Botulinum* Type C Progenitor Toxin. *Biochem Biophys Res Commun*. 319(2): 327-33 (2004).