

Title	Multivalency effects of hemagglutinin component of type B botulinum neurotoxin complex on epithelial barrier disruption
Author(s)	阿松, 翔
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/69453">https://hdl.handle.net/11094/69453</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 阿松 翔	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 堀 口 孝 三
	副 査 大阪大学教授 下 邊 亨
	副 査 大阪大学教授 飯 田 哲 也
<b>論文審査の結果の要旨</b>	
<p>ボツリヌス毒素複合体は致死性の神経麻痺を主症状とする食中毒を引き起こす。毒素複合体の構成成分の一つであるヘマグルチニン(HA)は糖鎖結合による細胞表面接着とE-カドヘリン結合による上皮細胞間バリア破壊の少なくとも二つの特異的機構により毒素の腸管吸収を促進し、経口毒性を顕著に増大させることが知られている。HAは三つのプロトマーで構成されており(三量体)、各プロトマーが糖鎖およびE-カドヘリンに結合可能である。本論文では三量体を形成しない欠損変異体を調製し、野生型との比較を行った。その結果、HAの多価性がクラスター型のE-カドヘリンへの結合及びCaco-2細胞表面への接着を増大し、バリア破壊活性を増強することを明らかにした。また、パルス・チェイス法によってHAはまず糖鎖を介してCaco-2細胞底部表面へ結合後、側部表面へ移動することを明らかにした。HAの多価性がバリア破壊活性に及ぼす影響とバリア破壊におけるHAの動態を解明した本論文は、ボツリヌス毒素の腸管吸収機構を理解する上で重要な意義をもつと認め、学位に値すると考えられる。</p>	

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

氏名 Name	阿松 翔
論文題名 Title	Multivalency effects of hemagglutinin component of type B botulinum neurotoxin complex on epithelial barrier disruption (B型ボツリヌス神経毒素複合体を構成するヘマグルチニン成分の多価性が上皮細胞間バリア破壊活性に及ぼす影響)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕 ボツリヌス神経毒素(botulinum neurotoxin, BoNT)はボツリヌス菌 (<i>Clostridium botulinum</i>)及び一部の <i>C. butyricum</i> や <i>C. barrati</i> が産生するタンパク質外毒素である。BoNTは主に末梢神経でSNARE(soluble NSF attachment protein receptor)タンパク質を切断してシナプス小胞の膜融合を阻害する。神経伝達物質の放出が阻害された結果、致命的な弛緩性麻痺を引き起こされる。BoNTはA-G型の血清型に分類され、主としてA、B、E及びF型がヒトに中毒を引き起こす。BoNTは無毒成分と複合体を形成してM毒素、L毒素及びLL毒素として産生される。無毒成分の一つであるHA(Hemagglutinin)は、血清型A及びB型では、糖鎖結合による細胞表面接着とE-カドヘリン結合による上皮細胞間バリア破壊の少なくとも二つの特異的機構によりBoNTの腸管吸収を促進し、経口毒性を顕著に増大させることが知られている。HAはHA1、HA2およびHA3の三つのサブコンポーネントで構成される。HAの立体構造は、HA1:HA2:HA3が2:1:1で結合したプロトマーが三つ会合して三本の腕のような特異的な構造を形成している(S. Amatsu, et al. 2013)。HAはプロトマー(一本腕)毎に糖鎖およびE-カドヘリン結合サイトを含有するため、三本腕であるHA複合体は同時に複数のリガンドとの結合が可能である。本研究では、B型HAの多価性が上皮細胞間バリア破壊活性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 多価性の比較を行うために、B型全長HA及びmini-HAと呼ばれる欠損変異体を大腸菌発現系を用いて調製した。mini-HAは、三量体形成ドメインを欠損させた変異体であり、プロトマー毎の全ての糖鎖およびE-カドヘリン結合サイトを含まない一本腕のHAである。精製したmini-HAは緩衝液中で単量体及び二量体として混在していたため、ゲルろ過クロマトグラフィー(size-exclusion chromatography, SEC)を用いて分画した。mini-HAの単量体及び二量体画分を再度SECに供し、分画後もそれぞれ単量体及び二量体が主成分であることを確認した。各HAの上皮細胞間バリア破壊活性を、Caco-2細胞を用いた経上皮電気抵抗値(trans epithelial electric resistance, TER)測定により評価した。その結果、HAは多価であるほど効果的に細胞間バリアを破壊した。各HAとE-カドヘリンとの結合をプルダウン法またはELISAにより解析した。HAをビーズに固相化したプルダウン法では、各HAは同様にE-カドヘリンと結合した。一方で、E-カドヘリンをプレートに固相化したELISAでは、HAは多価であるほど強くE-カドヘリンと結合した。HAの上皮細胞間バリア破壊では、糖鎖を介した側底部細胞表面への接着がE-カドヘリンへの結合を促進する役割として重要であると考えられている。そこで、単層培養したCaco-2細胞の側底部細胞表面への各HAの接着をcell-ELISAを用いて定量した。その結果、HAは多価であるほど強く側底部細胞表面に結合した。HA機能欠損変異体を用いたcell-ELISAにより、HAはCaco-2細胞の側底部表面に糖鎖依存的に結合することが示された。蛍光免疫染色法により、単層培養したCaco-2細胞の側底部側から4℃で結合させたHAは細胞の底部表面のみに局在し、E-カドヘリンが主として局在する側部表面には局在しなかった。そこで、パルスチェイス法により底部表面結合後のHAの動態を解析した。37℃で細胞運動を活発化させると、底部細胞表面に結合したHAの一部は側部細胞表面へ移行した。E-カドヘリンに結合しない変異体はパルス時に野生型と同様に底部細胞表面に結合したが、チェイス後も側部細胞表面へ移行しなかった。この底部から側部細胞表面への移行は、HAが多価であるほど増大した。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕 HAの多価性は上皮細胞間バリア破壊活性を増強することが明らかになった。Caco-2細胞の側底部側から添加された時、HAはまず底部細胞表面に糖鎖を介して接着した後、側部細胞表面へと移行することが明らかになった。この移行はE-カドヘリンとの結合により惹起されることが示唆された。HAの多価性は、クラスター型E-カドヘリンへの結合、側底部細胞表面への糖鎖を介した接着及び底部から側部細胞表面への移行を増強した。以上の結果より、HAの多価性は少なくとも上記三つの機能を増強することにより上皮細胞間バリアをより効果的に破壊することが示唆された。</p>	