

課題番号	LS082
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 22 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ボツリヌス毒素複合体の体内侵入機構の解明と経粘膜ワクチンデリバリーとしての応用
研究機関・ 部局・職名	大阪大学・微生物病研究所・特任准教授
氏名	藤永由佳子

1. 当該年度の研究目的

ボツリヌス毒素複合体の体内侵入機構の解析
 経口摂取されたボツリヌス毒素複合体は、その構成成分の1つである HA (hemagglutinin) コンポーネントを介して、腸管上皮細胞バリアを通過して体内に移行する。HA による本毒素の腸管上皮細胞バリア通過の分子機構解明のため、当該年度は、本研究に必要である HA の大腸菌発現系を用いた大量発現および再構成系の確立を行うことを目的とする。

2. 研究の実施状況

研究計画全体に必要となるボツリヌスHA(HA1、HA2、HA3の3つの異なるサブコンポーネントから構成される)の大腸菌発現系を用いた大量発現、再構成系の確立を以下のステップにより実施した。

- ボツリヌス HA1、HA2、HA3 をそれぞれ、大腸菌で大量に発現・精製する最適条件を検討した。
- 1.で精製した HA1、HA2、HA3 より、HA 複合体を再構成する最適な条件を決定した。HA 複合体の細胞間バリア破壊活性(本活性は1種の HA サブコンポーネントのみでは発現しない)およびゲル濾過をそれぞれ、機能的再構成と生化学的再構成の指標とした。
- 2.で再構成した HA の溶液中には、再構成されなかった HA のサブコンポーネントが混入していることが、ゲル濾過解析で明らかになった。そこで、再構成 HA のみを精製することを試みた。その結果、プルダウン法により簡便かつ高い回収率で再構成 HA を精製することに成功した。
- 今後の研究に用いる再構成 HA の保存条件について、細胞間バリア破壊活性を指標に検討を行った。
- ボツリヌスHAが腸管上皮細胞管腔から transcytosis により上皮の基底膜側(体内)に侵入する機構を明らかにするため、ボツリヌス HA の3つのサブコンポーネントのうち、細胞と相互作用することが明らかになっている HA1 と HA3 にアミノ酸変異を導入したミュータントを

様式19 別紙1

作製し、さらにそのミュータントサブコンポーネントを含む HA 複合体での再構成を行った。再構成はゲル濾過法で確認した。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 1 件	(掲載済み一査読有り) 計 1 件 Sugawara Y, <u>Fujinaga Y</u> . The botulinum toxin complex meets E-cadherin on the way to its destination. Cell Adh Migr. 2011, 8;5(1) 34-36. DOI: 10.4161/cam.5.1.13574 (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件
会議発表 計 0 件	専門家向け 計 0 件 一般向け 計 0 件
図書 計 0 件	
産業財産権 出願・取得状況 計 0 件	(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 0 件
Webページ (URL)	http://www.biken.osaka-u.ac.jp/news16813.html 大阪大学: http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next 大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室: http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html
国民との科学・技術対話の実施状況	なし
新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件	なし

様式19 別紙1

その他	なし
-----	----

4. その他特記事項

なし

実施状況報告書(平成22年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額
直接経費	128,000,000	0	45,045,000	82,955,000
間接経費	38,400,000	0	13,513,500	24,886,500
合計	166,400,000	0	58,558,500	107,841,500

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度 執行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額
直接経費	0	45,045,000	0	45,045,000	233,415	44,811,585
間接経費	0	13,513,500	0	13,513,500	0	13,513,500
合計	0	58,558,500	0	58,558,500	233,415	58,325,085

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	233,415	実験試薬
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	0	
直接経費計	233,415	
間接経費計	0	
合計	233,415	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
				0		
				0		
				0		