

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23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・特任教授
氏名	藤永由佳子

1. 当該年度の研究目的

<p>プロジェクト A:ボツリヌス毒素複合体の体内侵入機構の解明</p> <p>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つである無毒成分を介して、まず最初に transcytosis により腸管上皮細胞バリアを通過すると考えられる。この分子機構を明らかにするため、ボツリヌス無毒成分が結合する上皮細胞上の基質分子を探索する。</p> <p>プロジェクト B: ボツリヌス無毒成分の三次元構造解析</p> <p>ボツリヌス無毒成分の機能解析及び応用研究を推進する上で、現在不明である無毒成分の三次元構造の解明は重要である。そこで、本タンパク質の三次元構造について、X 線結晶構造解析などを中心に行うことにより明らかにしたい。当該年度は結晶の作製条件の検討を行う。</p> <p>プロジェクト C: ボツリヌス無毒成分を利用した粘膜ワクチンの有効性の解析</p> <p>粘膜ワクチンは、粘膜組織にワクチン抗原を投与し、抗原特異的な粘膜免疫を活性化させる方法であり、粘膜感染症のワクチンとしての開発が期待されている。ボツリヌス無毒成分は粘膜上皮バリア通過作用を持つことから粘膜ワクチンの輸送体として有効である可能性が高い。そこで、当該年度は、無毒成分とモデル抗原 (OVA) などを用い、特異的免疫誘導能について解析を行う。</p>

2. 研究の実施状況

<p>プロジェクト A:ボツリヌス毒素複合体の体内侵入機構の解明</p> <p>ボツリヌス無毒成分が結合する腸管粘膜上皮細胞中の基質分子をプルダウン法などによって探索した。その結果基質分子候補を見出した。そこで、本分子とボツリヌス無毒成分の相互作用が、<i>in vivo</i> におけるボツリヌス神経毒素の腸管吸収およびボツリヌス症発症にどの程度関与しているのかを明らかにするため、本分子を改変した遺伝子改変マウスの作製を行っている。</p> <p>プロジェクト B: ボツリヌス無毒成分の三次元構造解析</p> <p>各種血清型の無毒成分を flag tagなどを付加したリコンビナントタンパク質として大腸菌で大量発現した。これらのタンパク質をそれぞれの tag に対するアフィニティーカラムで精製した後、必要に応じてイオン交換カラムあるいはゲル濾過カラムを用いて、さらに高純度に精製を行った。これらのタンパク質を各種の結晶化溶液中でインキュベートし、結晶化を試みた。そのうちいくつかの条件でタンパク質の結晶が得られた。</p>

様式19 別紙1

プロジェクト C：ボツリヌス無毒成分を利用した粘膜ワクチンの有効性の解析

各種血清型のボツリヌス無毒成分を大腸菌でリコンビナントタンパク質として大量発現した。その後、それらのリコンビナントタンパク質から混入している LPS(リポポリサッカライド)を除去し、粘膜ワクチン実験に用いた。本試料をモデル抗原 (OVA) と共にマウスに経鼻投与し効果を解析した。その結果、ボツリヌス無毒成分は OVA に対する特異的抗体の誘導能を持つことが明らかになった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件 Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Jin Y, Terao Y, <u>Fujinaga Y</u>, Kawabata S. Strptolysin S Contributes to Group A Streptococcal Translocation across an Epithelial Barrier. <i>J. Biol. Chem.</i> 286: 2750-2761 (2011)</p> <p>Nishimura K, Kitadokoro K, Takegahara Y, Sugawara Y, Matsumura T, Karatani H, <u>Fujinaga Y</u>. Crystallization and preliminary crystallographic studies of the HA3 subcomponent of the type B botulinum neurotoxin complex. <i>Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.</i> 67(Pt 10): 1244-6 (2011).</p> <p>Sugawara Y, <u>Fujinaga Y</u>. The botulinum toxin complex meets E-cadherin on the way to its destination. <i>Cell. Adh. Migr.</i> 5: 34-36, (2011)</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 2 件 <u>藤永由佳子</u> ボツリヌス神経毒素複合体により上皮バリア破壊、感染・炎症・免疫 41 巻、228-231 (2011)</p> <p><u>藤永由佳子</u> ボツリヌス毒素の研究、化学療法の領域 27 巻、102-109 (1886-1893) (2011) (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 7 件</p>	<p>専門家向け 計 7 件 <u>藤永由佳子</u>、ボツリヌス毒素の巧みな体内侵入戦略 第2回愛媛微生物ネットワークフォーラム、愛媛大学「微生物の環境適応と感染症リスクに関する共同研究拠点形成およびフォーラム開催」事業主催、松山市、2011 年 11 月 26 日</p> <p><u>藤永由佳子</u>、菅原 庸、松村 拓大 ボツリヌス毒素の腸管上皮バリア通過機構 日本細菌学会総会 長崎市、2012 年 3 月 27～29 日</p> <p><u>藤永由佳子</u>、菅原 庸、松村 拓大 ボツリヌス毒素の腸管上皮バリア通過機構 日本細菌学会総会 長崎市、2012 年 3 月 27～29 日</p>

様式19 別紙1

	<p><u>Yukako Fujinaga</u>, Yo Sugawara, Takuhiro Matsumura; Mechanisms underlying intestinal absorption of botulinum toxin complex. IUMS 2011, Sapporo, 6-10 Sep. 2011</p> <p>Yo Sugawara, Takuhiro Matsumura, <u>Yukako Fujinaga</u> ; Botulinum hemagglutinin disrupts E-cadherin-mediated cell to cell adhesion and the epithelialintercellular barrier. IUMS 2011, Sapporo, 6-10 Sep. 2011</p> <p>Analysis of interaction of type B botulinum hemagglutinin with E-cadherin Yo Sugawara, Takuhiro Matsumura, <u>Yukako Fujinaga</u> Toxins 2011 7th International Conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins. Santa Fe, USA, 2-5 Oct. 2011</p> <p>Matsumura T, Sugawara Y, and <u>Fujinaga Y</u>. The role of botulinum HA1 protein in the interaction with intestinal epithelium. 48th IBRCC 2011, Intergency Botulinum Research Coordinating Committee Meeting, Santa Fe, USA, 5-7 Oct. 2011</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図 書 計 2 件</p>	<p><u>Fujinaga Y</u>, Matsumura T, Sugawara Y. Analysis of botulinum toxin - intestinal epithelial barrier interaction using epithelial monolayer culture systems. <i>In: Schulz MA (ed.) CACO-2 Cells and Their Users</i>. Nova Science Publishers, Inc. pp.101-111 (2011), total 205 pages</p> <p><u>Fujinaga Y</u>. Passage of botulinum toxins through the intestinal barrier. <i>In: Rasetti-Escargueil C. and Surman-Lee S. (eds.) Clostridium botulinum: A Spore Forming Organism and a Challenge to Food Safety</i>. Nova Science Publishers, Inc. (2011), total 278 pages.</p>
<p>産 業 財 産 権 出 願 ・ 取 得 状 況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webペ ージ (URL)</p>	<p>大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next</p> <p>大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</p>
<p>国 民 と の 科 学 ・ 技 術 対 話 の 実 施 状 況</p>	<p>大阪大学学術研究機構会議の研究ときめきカフェ、「ボツリヌス食中毒の秘密」、2012年1月19日、京阪電車中之島線なにわ橋駅地下一階コンコースアートエリアビーワン、一般人、参加者数 60～70 人、内容:ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素に関する基本的な知見を紹介するとともに、本毒素が大きなタンパク質毒素であるにも関わらず、消化管から活性を保った状態で血液中に移行し、末梢神経に到達してその毒性を発現する機構のうち、現在までに明らかになっていることを解説した。</p>

様式19 別紙1

新聞・ 一般雑 誌等掲 載 計1件	産経新聞、2012年1月22日、1/3ページ、「旬”な大学、「大阪大(2)躍動する若手研究者 学内助成事業が スタート」 http://sankei.jp.msn.com/west/west_life/news/120122/wlf12012216070014-n1.htm
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	128,000,000	45,045,000	0	82,955,000	0
間接経費	38,400,000	13,513,500	0	24,886,500	0
合計	166,400,000	58,558,500	0	107,841,500	0

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	当該年度返還 額
直接経費	44,811,585	0	0	44,811,585	36,329,791	8,481,794	0
間接経費	13,513,500	0	0	13,513,500	7,255,713	6,257,787	0
合計	58,325,085	0	0	58,325,085	43,585,504	14,739,581	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	19,861,838	レーザーコンバイナシステム、試薬等
旅費	1,672,320	学会参加(TOXIN2011)等
謝金・人件費等	13,631,592	特任助教人件費、派遣料金
その他	1,164,041	実験動物施設利用料、学会参加費等
直接経費計	36,329,791	
間接経費計	7,255,713	
合計	43,585,504	

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
CSU用レーザーコ ンバイナシステム	横河電機・LDSY- 495/488/561-YHQSP2	1	6,982,500	6,982,500	H24.11.28	大阪大学
安全キャビネット	オリエンタル技研・ LAL-1500XA2S	2	1,417,500	2,835,000	H23.11.29	大阪大学
インキュベータ	三洋電機・MIR- 554	1	655,200	655,200	H23.12.16	大阪大学
クロマトチャンバ	トミ-精工・TCC- 1207	1	1,267,350	1,267,350	H24.3.16	大阪大学
吸光マイクロプレ ートリーダー	サーモフィsherサイエンス MultiskanFC ベンシックモデル	1	737,100	737,100	H24.3.26	大阪大学