

**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24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

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

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。基質候補が機能分子であることを、*in vivo* 共染色、KO マウス（必要に応じて作製）などにより証明する。HA の E-cadherin に対する種特異的認識を利用して rat E-cadherin (HA に結合しない) knock in マウスを作製する。

プロジェクトB:ボツリヌス無毒成分の三次元構造解析

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する。

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

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。前年度でボツリヌス無毒成分の有効性がモデル抗原(OVA)を用いた系で確認された。そこで、当該年度は、ウイルス抗原などを用い、特異的免疫誘導能について解析を行う。

2. 研究の実施状況

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

前年度に得られたボツリヌス無毒成分 (HA 成分) が結合する上皮細胞上の基質分子候補について、機能分子であることを確認するため、基質候補の抗体を用いた *in vivo* 共染色を行った結果、HA と基質候補が共局在することが明らかになった。基質候補分子との結合に必要な HA 成分の部位を明らかにするため、HA 成分 (HA1/HA2/HA3) の再構成系にて解析を行った。その結果、HA1、HA2、HA3 それぞれ単独には結合しないが、再構成した HA 成分 (HA1/HA2/HA3) に結合することが明らかになった。基質候補の KO マウスを作製した。また rat 型 E-cadherin (HA に結合しない) knock in マウスの作製を進めている。

プロジェクトB:ボツリヌス無毒成分の三次元構造解析

前年度までに得られた無毒成分の結晶について、さらに結晶化条件の改良を行いつつ、スプリング 8 にて X 線回折データの取得を行った。その結果、分解能が未だ十分とは言えないが、全体像が観測可能となった。

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

様式19 別紙1

ボツリヌス無毒成分の有効性がウイルス抗原の場合においても確認できるかどうかについて解析を行った結果、有効であることが明らかになった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文</p> <p>計 0 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 0 件</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表</p> <p>計 15 件</p>	<p>専門家向け 計 14 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yo Sugawara, Takuhiro Matsumura, <u>Yukako Fujinaga</u>. Functional analysis of botulinum hemagglutinin using recombinant proteins, The 5th International CVRDC-RIMD Joint Symposium, 濟州島, 韓国, 10-12 May 2012 2. Matsumura T, Sasaki K, Sugawara Y, Kohda T, Takahashi M, Kozaki S, Ikuta K, <u>Fujinaga Y</u>. Preparation and characterization of human monoclonal antibodies against type B botulinum neurotoxin, The 49th IBRCC 2012, Baltimore, USA, 4-7 Sep. 2012 3. <u>Fujinaga Y</u>, Sugawara Y, Matsumura T. Strategies of botulinum neurotoxin complex to cross the intestinal epithelial barrier, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 11-14 Sep. 2012 4. <u>Fujinaga Y</u>. Interaction of BoNT complex with intestinal epithelial barrier, Toxins 2012, Miami Beach, USA, 5-8 Dec. 2012 5. Matsumura T, Sugawara Y, Yutani M, <u>Fujinaga Y</u>. Type A HA-positive botulinum toxin complex crosses the intestinal epithelial barrier via M cell, Toxins 2012, Miami Beach, USA, 5-8 Dec. 2012 6. Sugawara Y, Matsumura T. and <u>Fujinaga Y</u>. Mechanism of cytotoxicity induced by botulinum type C hemagglutinin, Toxins 2012, Miami Beach, USA, 5-8 Dec. 2012 7. 菅原 庸、松村 拓大、<u>藤永由佳子</u> C型ボツリヌスHAによる細胞障害活性の解析 第59回トキシシンポジウム 帯広市 平成24年8月30～ 31日 8. 菅原 庸、松村 拓大、<u>藤永由佳子</u> C型ボツリヌス HA による細胞障害活性についての解析 第65回日本細菌学会関西支部総会 神戸市 平成24年11月17日 9. 佐々木 薫、松村 拓大、菅原 庸、幸田 知子、高橋 元秀、小崎 俊司、生田 和良、<u>藤永由佳子</u> ボツリヌス神経毒素を中和するヒト型モノクローナル抗体の作製 第65回日本細菌学会関西支部総会 神戸市 平成24年11月17日 10. 菅原 庸、松村 拓大、<u>藤永由佳子</u> C型ボツリヌスヘマグルチニンによる細胞障害活性の解析 第85回日本生化学会大会 福岡市 平成24年12月14～16日 11. 松村 拓大、佐々木 薫、菅原 庸、幸田 知子、小崎 俊司、高橋 元秀、生田 和良、<u>藤永由佳子</u> Development of human monoclonal antibodies against botulinum neurotoxin 第85回日本生化学会大会 福岡市 平成24年12月14～ 16日 12. 菅原 庸、松村 拓大、<u>藤永由佳子</u> E型ボツリヌス菌機能未知タンパク質・Orfxについての解析 千葉市 第86回日本細菌学会総会 平成25年3月18～ 20日 13. 佐々木 薫、松村 拓大、菅原 庸、幸田 知子、小崎 俊司、高橋 元秀、<u>藤永由佳子</u> ボツリヌス神経毒素を強力に中和するヒト型モノクローナル抗体の作製 千葉市 第86回日本細菌学会総会 平成25年3月18～ 20日 14. 松村 拓大、菅原 庸、油谷 雅広、<u>藤永由佳子</u> ボツリヌスA型HA含有神経毒素複合体はM細胞を介して腸管上皮バリアを通過する 千葉市 第86回日本細菌学会総会 平成25年3月18～ 20日 <p>一般向け 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 15. <u>藤永由佳子</u> ボツリヌス食中毒～毒素の持つ巧みな戦略について～ 第8回定例講演会 食を守り育てる (東洋食品工業短期大学主催) 川西市 平成24年11月22日

様式19 別紙1

<p>図書 計1件</p>	<p>1. Fujinaga Y, Yo Sugawara, Takuhiro Matsumura. Uptake of Boulinum Neurotoxin in the Intestine. In: A. Rummel and T. Binz (eds.), Botulinum Neurotoxins, Current Topics in Microbiology and Immunology 364, Springer, 45-59 (2013)</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 (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 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>ボツリヌス食中毒～毒素の持つ巧みな戦略について～ 平成24年11月22日兵庫県川西市東洋食品工業短期大学、対象者：大学、企業、学生、一般人、参加者数：約200人、第8回定例講演会 食を守り育てる（東洋食品工業短期大学主催）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した。さらに、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>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24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	46,955,000	36,000,000	0
間接経費	38,400,000	13,513,500	14,086,500	10,800,000	0
合計	166,400,000	58,558,500	61,041,500	46,800,000	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	8,481,794	46,955,000	0	55,436,794	55,431,256	5,538	0
間接経費	6,257,787	14,086,500	0	20,344,287	17,085,135	3,259,152	0
合計	14,739,581	61,041,500	0	75,781,081	72,516,391	3,264,690	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	37,620,258	液体クロマトグラフィシステム、超微量分光光度計等
旅費	1,422,016	学会参加(TOXINS2012)等
謝金・人件費等	14,991,709	特任助教人件費、派遣料金
その他	1,397,273	実験動物施設利用料、学会参加費等
直接経費計	55,431,256	
間接経費計	17,085,135	
合計	72,516,391	

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
ロータリーエバポ レーター	東京理科 N-1200AV-W型	1	653,667	653,667	H24.6.11	大阪大学
実験動物用ガス麻 酔システム	DSファーマバイオメディカ ル SF-B01	1	946,050	946,050	H24.7.27	大阪大学
制御PC	モレキュラーデバイスジャ パン MMNXUPG67	1	1,275,750	1,275,750	H24.11.13	大阪大学
ImageQuant LAS 4000miniシステム	英国GEヘルスケア社製	1	4,063,500	4,063,500	H24.11.29	大阪大学
マイクロ冷却遠心 機	クボタ Model3740	1	674,310	674,310	H24.12.18	大阪大学
超微量分光光度計	米国Thermo Fisher Scientific社製 NanoDrop 2000c	1	1,785,000	1,785,000	H25.1.23	大阪大学
液体クロマトグラフィ システム	英国GEヘルスケア 社製 AKTA pure L1	1	4,725,000	4,725,000	H25.1.31	大阪大学
純水製造装置	独国メルク社製 Elix Essential UV 5	1	1,636,834	1,636,834	H25.3.11	大阪大学
sCMOSカメラ	横河電機機軸社製 DC- 152Q-YHQ-SP3	1	2,044,875	2,044,875	H25.3.21	大阪大学