

**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25年度)**

本様式の内容は一般に公表されず

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>前年度までにボツリヌス無毒成分が結合し、毒素の transcytosis を引き起こす上皮細胞上の基質分子候補が得られ、その KO マウスの作製が行われた。当該年度は、KO マウスと野生型マウスで、経口投与ボツリヌス毒素複合体に対する感受性、および毒素の吸収経路を比較解析し、本毒素の腸管上皮バリア通過機構を明らかにすることを目的とする。また 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 マウスを作製し、野生型マウスとの経口毒性の比較も行う。</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により明らかにする。</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>前年度までにボツリヌス無毒成分の粘膜ワクチンの輸送体としての有効性が実際の病原微生物由来抗原を用いた系で確認された。当該年度は、本抗原とボツリヌス無毒成分混合物をマウス経鼻摂取した場合における抗原の局在解析などを行い、ボツリヌス無毒成分の経粘膜ワクチンデリバリー手法としての有用性を検証する。</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基質分子候補の KO マウスおよび野生型マウスでボツリヌス毒素複合体の経口感受性、および毒素の吸収経路の比較解析を行った。その結果、KO マウスは、野生型マウスに比べ、経口投与したボツリヌス A 型神経毒素複合体に対する感受性が著しく低下していた。一方、腹腔内投与した本毒素複合体に対する感受性は両者のマウスで差異は認められなかった。従って、本基質は、生体レベルにおいて、本毒素の腸管侵入に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。</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>前年度までに得られた無毒成分 (whole HA) 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、世界に先駆けて whole HA の結晶構造の解明に成功した(J. Biol. Chem. 2013)。</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>本抗原とボツリヌス無毒成分混合物をマウス経鼻摂取した場合における抗原の局在を解析した結果、抗原とボツリヌス無毒成分の共局在が観察されたことから、ボツリヌス無毒成分がワクチンデリバリーとして抗原を粘膜下へ輸送していることが確認された。また炎症性サイトカイン産生の誘導を引き起こすことなく、血清中の抗原特異的 IgG および気道洗浄液中の特異的 IgA が誘導された。従って本成分は、経粘膜ワクチンデリバリーとして機能していると考えられる。</p>

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 2 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 1 件 Amatsu S., Sugawara Y., Matsumura T., Kitadokoro K. and <u>Fujinaga Y.</u> Cristal structure of <i>Clostridium botulinum</i> whole hemagglutinin reveals a huge triskelion-shaped molecular complex <i>J. Biol. Chem.</i> 288(49):35617-35625, 2013 (掲載済み一査読無し) 計 1 件 <u>藤永由佳子</u> 重篤な食中毒を引き起こす細菌毒素の研究の最前線 滋賀毒素 (ベロ毒素) とボツリヌス毒素 <i>ファルマシア</i> 49 巻、764-768 (2013) (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 12 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件 1. <u>Fujinaga Y.</u> Interaction of botulinum toxin complex with instinal epithelial barrier, <i>ETOX16</i>, Freiburg, Germany, 22-26, June 2013. 2. Matsumura T, Sasaki K., Sugawara Y, Yutani M, Kohda T., Takahashi M., Ikuta K., <u>Fujinaga Y.</u> Development of human monoclonal antibodies effectively neutralizing botulinum neurotoxin, <i>The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity</i>, Awaji, Japan, 10-13 Sep. 2013. 3. Matsumura T, Sasaki K., Sugawara Y, Yutani M., Kohda T, Takahashi M. Kozaki S., Ikuta K. and <u>Fujinaga Y.</u> Characterization of Human Monoclonal Antibodies Effectively neutralizing Type B Botulinum Neurotoxin. <i>50th IBRCC 2013</i>, Annapolis, USA, 20-23 Oct. 2013. 4. Sugawara Y, Matsumura T, Yutani M, <u>Fujinaga Y.</u> Sugar-Binding Potentiates The Epithelial Barrier-Disrupting Activity Of The Type B Hemagglutinin Complex. <i>50th IBRCC 2013</i>, Annapolis, USA, 20-23 Oct. 2013 5. <u>Fujinaga Y.</u>, Mechanisms underlying intestinal absorption of botulinum toxin complex. <i>2014 ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting</i>, Washington DC, USA, 27-29 Jan . 2014. (招待講演) 6. 松村 拓大、佐々木 薫、菅原 庸、油谷 雅広、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 宍粟市 <i>第 60 回毒素シンポジウム</i> 平成 25 年 7 月 17～ 19 日 7. <u>藤永由佳子</u> ボツリヌス食中毒 ～毒素の巧みな体内侵入戦略について～ <i>岡山 第 8 回 OMIC 事業推進セミナー</i> 平成 26 年 3 月 6 日 8. <u>藤永由佳子</u> ボツリヌス毒素の腸管からの侵入機構 東京 <i>第 87 回日本細菌学会総会</i> 平成 26 年 3 月 26～ 28 日(招待講演) 9. 菅原 庸、松村 拓大、北所 健悟、<u>藤永由佳子</u> B 型ボツリヌスヘマグルチニン複合体の構造機能解析 東京 <i>第 87 回日本細菌学会総会</i> 平成 26 年 3 月 26～ 28 日 10. 油谷 雅広、松村 拓大、菅原 庸、<u>藤永由佳子</u> 宿主腸管内環境におけるボツリヌス毒素複合体の解離阻害現象の解析 東京 <i>第 87 回日本細菌学会総会</i> 平成 26 年 3 月 26～ 28 日 一般向け 計 2 件 1. <u>藤永由佳子</u> 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</p>

様式19 別紙1

	<p>ーとしての応用 東京 最先端研究開発支援プログラム FIRST シンポジウム 平成26年2月28～3月1日</p> <p>2. 藤永由佳子 毒と薬～ボツリヌス毒素が体内に侵入する仕組みの秘密から サイエンスカフェ 大阪 平成26年3月17日</p>
<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>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>1. 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 東京 最先端研究開発支援プログラム FIRST シンポジウム 平成26年2月28～3月1日、対象者：大学、企業、学生、一般人、参加者数：約500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した。さらに、本研究で得られた最新の知見についてわかりやすくまとめてポスターにて紹介した。</p> <p>2. 毒と薬～ボツリヌス毒素が体内に侵入する仕組みの秘密から サイエンスカフェ 大阪 平成26年3月17日、対象者：大学、企業、学生、一般人、参加者数：約20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2件</p>	<p>1. 京都新聞 2013年11月13日 25面 (社会3) 「毒素の一部 立体構造の解明 ボツリヌス菌」</p> <p>2. 日刊工業新聞 2013年11月14日 19面 「(ボツリヌス菌発生関与蛋白質) 3D構造解明 ワクチン開発に道」</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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せん

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	92,000,000	36,000,000	0	0
間接経費	38,400,000	27,600,000	10,800,000	0	0
合計	166,400,000	119,600,000	46,800,000	0	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	5,538	36,000,000	0	36,005,538	36,005,538	0	0
間接経費	3,259,152	10,800,000	0	14,059,152	14,059,152	0	0
合計	3,264,690	46,800,000	0	50,064,690	50,064,690	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	20,496,808	嫌気ワークステーション、超低温フリーザー等
旅費	1,339,599	学会参加(50th IBRCC)等
謝金・人件費等	12,199,317	特任助教人件費、技術補佐員人件費、派遣料金等
その他	1,969,814	実験動物施設使用料、学会参加費等
直接経費計	36,005,538	
間接経費計	14,059,152	
合計	50,064,690	

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
高速大容量冷却遠 心機	クホタ 7000	1	1,470,000	1,470,000	2013/4/8	大阪大学
嫌気ワークステー ション コンセプト 400	英国RUSKINN TECHNOLOGY RCF002	1	4,536,000	4,536,000	2013/10/29	大阪大学
超低温フリーザー 貯蔵ラック付	パナソニックヘルスケア (株) MDF- U700VX-PJ	1	2,531,760	2,531,760	2013/11/18	大阪大学
超低温フリーザー	パナソニックヘルスケア (株) MDF- U53VS6-PJ	1	2,027,760	2,027,760	2014/1/16	大阪大学