

平成21年6月5日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18799011  
 研究課題名（和文）新しく発見したボツリヌス D 型毒素受容体 PE と毒素との相互作用の解析  
 研究課題名（英文）Analysis of interaction between botulinum neurotoxin type D and Phosphatidylethanolamine

研究代表者  
 塚本 健太郎（TSUKAMOTO KENTARO）  
 藤田保健衛生大学・医学部・助教  
 研究者番号：80434596

研究成果の概要：ボツリヌス神経毒素（A～G 型）は型特異的な受容体に結合する。そのうち、ボツリヌス D 型毒素は他の型とは異なり、グリセロリン脂質の一つ PE に結合する。本研究では、ボツリヌス D 型神経毒素と PE の分子間相互作用について調べ、毒素分子内の PE 認識に関わるアミノ酸残基を特定した。さらに表面プラズモン共鳴による結合解析の実験系を構築し、蛋白質-脂質の分子間相互作用について定量的に解析することを可能にした。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2006 年度 | 1,300,000 | 0       | 1,300,000 |
| 2007 年度 | 1,000,000 | 0       | 1,000,000 |
| 2008 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,200,000 | 270,000 | 3,470,000 |

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：*Clostridium botulinum*、ボツリヌス毒素、受容体、ガングリオシド、  
 ホスファチジルエタノールアミン、表面プラズモン共鳴

## 1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス神経毒素は、A～G 型からなり、極めて致死性が高い毒素である。毒素は型間で共通のドメイン構造をもつが、細胞内に侵入する際の受容体は毒素型によって異なる。毒素受容体として蛋白質成分が特異性を決定づける重要な因子であると考えられてきたが、すべての型では同定されていない。我々は蛋白質成分以外に、細胞膜上の脂質分子ガングリオシド、ホスファチジルエタノールアミン（PE）に着目し、C 型および D 型毒

素については蛋白質成分よりこれら脂質分子が重要であると指摘してきた（Tsukamoto *et al.* 2005. *J. Biol. Chem.* 280: 35164）。また最近の成績からはガングリオシド、PE 以外の脂質分子に結合する毒素も発見した。以上のことからボツリヌス毒素は型間で異なる膜構成成分を認識する機構を有していると考えられる。

## 2. 研究の目的

ボツリヌス菌の産生する神経毒素（A～G

型)は強力な弛緩性麻痺を起こす。平成19年、感染症法の部分改正で、バイオテロ対策の観点からボツリヌス菌・毒素が「二種病原体等」に指定されている一方で、本毒素は痙性麻痺治療薬としても利用されている。これらの社会的重要性から、病原性発現機構の解明は急務とされているが、解決に至っていない。特に最重要課題である受容体に関し多くの研究がなされたが、全毒素型について同定及び機能解析は完了していない。

研究代表者らはこれまでC、D型毒素受容体の検索と機能解析を行ってきた。その結果、C型ではガングリオシドGD1b、GT1b、そしてD型ではホスファチジルエタノールアミンが受容体であることを発見した(JBC, 2005)。これらは、本毒素が各血清型により異なる細胞膜構成成分を認識し、多様な作用機構を有している事を示す。一方、機能解析が進行しない最大の原因として、これら個々の受容体成分と毒素との分子間結合を *in vitro* で定量的に解析する実験系が確立されていないことが挙げられる。

本研究ではこれらの毒素受容体分子の結合を定量的に解析する実験系を確立することで、毒素と受容体の相互作用を明確にすることを目的とした。現在、多くの受容体研究は蛋白質に主眼がおかれているが、本研究の最大の特徴は、蛋白質以外にも毒素と相互作用する脂質分子を発見し、毒素受容体として人工脂質膜上で再構築後、分子間の相互作用を解析する点にある。このような試みは未だなされていない。

### 3. 研究の方法

ボツリヌス毒素の作用過程における膜脂質分子の役割を解明するため、以下に焦点を当て、解析した。

#### (1) ボツリヌス毒素が結合する脂質分子の解析

マウス脳から抽出した総脂質画分に対する毒素の結合を TLC オーバーレイアッセイにより検討する。プローブには毒素の代わりに H<sub>c</sub> を用いるが、従来の方法では非特異結合が見られたため、ブロッキング法や基質の変更などを試み、新たな実験系を構築した。

#### (2) 毒素と膜構成分子の結合親和性の解析

種々の毒素結合分子を含有するリポソームを作製し、各型 H<sub>c</sub> との結合親和性を表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した生体分子相互作用解析装置 (BIACORE 2000) を用いて分析した。センサーチップには、リポソームを

二重膜構造を保持したまま固定化する L1 チップを用いた。

#### (3) 毒素の脂質認識に関与するアミノ酸残基の特定

ボツリヌス毒素の受容体認識はこれまで毒素分子の C 末端数十残基内にあると考えられてきた。実際 A 型、B 型毒素では C 末端領域に結合に関与するアミノ酸残基が集中している。しかしながら、他の型では詳細な解析はされておらず、特に D 型毒素は PE に結合し、他型とは異なる受容体認識領域を有していることが予想される。この点を明らかにするため、種々のキメラ変異体や、点変異体を作製し、結合活性を測定することで、各受容体特に脂質分子の認識に関わるアミノ酸の特定を試みた。

### 4. 研究成果

(1) これまで行ってきた TLC オーバーレイアッセイにおいて、ブロッキング剤を変更し、検出に化学発光基質とルミノイメージアナライザーを用いることで、従来よりも高感度な検出を可能とした。その結果、牛ボツリヌス症から分離された OFD05 株の産生する DC モザイク毒素の結合分子を検索した結果、GQ1b および複数のリン脂質に結合することがわかった。

(2) ボツリヌス神経毒素と脂質受容体の相互作用を検討するため、A, B, C, D, E 型毒素の受容体結合領域の組換え体 (H<sub>c</sub>) を作製し、GD1b, GT1b 及びホスファチジルエタノールアミン (PE) への結合について BIACORE2000 を用いて検討した。その結果、GD1b, GT1b に対しては C 型 H<sub>c</sub> のみが結合し、PE に対しては D 型 H<sub>c</sub> のみが結合した。A, B, E 型毒素の結合にもガングリオシドが関与すると考えられているが、本実験では結合が認められなかったことから、C 型毒素は他の型に比べてガングリオシドへの親和性が特に高いことがわかった。また、牛ボツリヌス症から新たに分離された菌が産生する DC モザイク毒素の結合特異性を調べた。DC モザイク毒素由来 H<sub>c</sub> は C 型 H<sub>c</sub> と 77% の相同性をもつことから、各種ガングリオシドへの結合活性を比較検討した結果、C 型 H<sub>c</sub> は GD1b>GT1b>GQ1b の強さで結合したのに対し、D/C モザイク H<sub>c</sub> は GQ1b>GT1b>GD1b の強さで結合した。このことから、C 型毒素及び D/C モザイク毒素と各ガングリオシドの親和性には、糖鎖末端のシアル酸が関与しており、この末端シアル酸は C 型毒素では結合を弱め、D/C モザイク毒素では逆に結合を強める働きがあると考えられた。一方、D 型 H<sub>c</sub> は PE 含有リポソームに対してわずかに結合し、この

相互作用はGD1bやGT1b共存下で増強されることがわかった。D型HcはGD1bあるいはGT1bだけを含有させたリポソームには結合しないため、これらのガングリオシドはD型毒素とPEの結合に対して補助的に働いていると考えられる。

(3) C型およびD型神経毒素と脂質受容体との結合様式を明らかにするため、CDモザイク毒素分子内の1112番目から1279番目(C末端)のアミノ酸をC型に置換したキメラ変異体(H<sub>c</sub>/DC1)、1223番目から1279番目を置換した変異体(H<sub>c</sub>/DC2)、1264番目から1279番目を置換した変異体(H<sub>c</sub>/DC3)を作製した。これらキメラ変異体の結合能をTLC overlay assayで調べると、H<sub>c</sub>/DC1はGD1bおよびGT1bに、H<sub>c</sub>/DC3はPEに結合した(図1)。

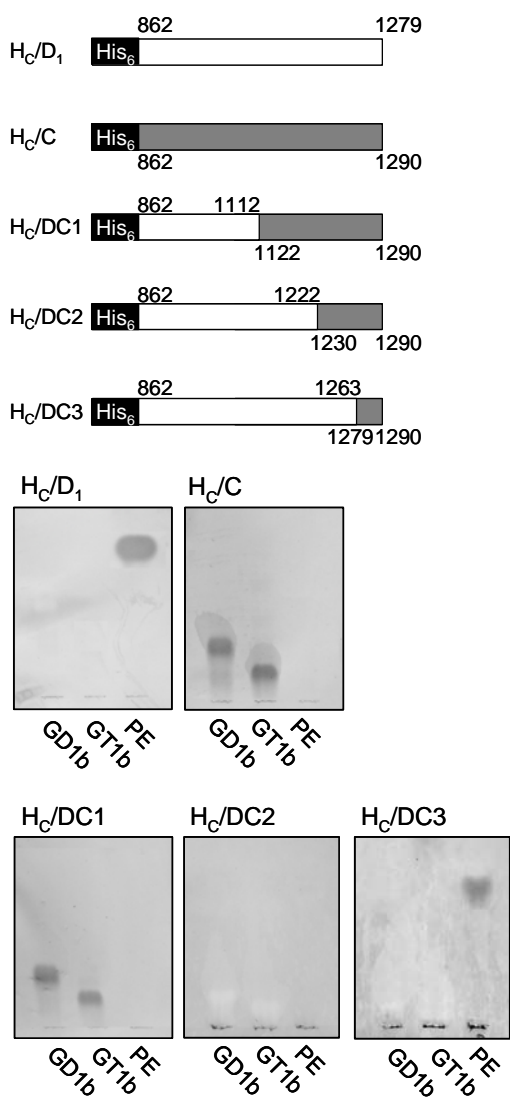


図1. DCキメラ変異体の結合特異性

他の毒素型でガングリオシド結合モチーフ

フと報告されているC型H<sub>c</sub>領域内の1257番目のトリプトファン(W1257)、1258番目のチロシン(Y1258)、1270番目のグリシン(G1270)をアラニンに置換した点変異体、W1257A、Y1258A、G1270Aを作製した。さらにC型にのみ特異的に存在する正電荷を持つアミノ酸残基H1282の変異体H1282A、H1282Eおよび全ての型で保存されているW1283の変異体を作製し、ラット脳シナプトソームに対する結合阻害実験を行い、未標識H<sub>c</sub>/Cおよび変異体のIC<sub>50</sub>を算出した(図2)。未標識H<sub>c</sub>/CのIC<sub>50</sub>は21 nMであった。W1283A、W1283FのIC<sub>50</sub>はそれぞれ56 nM、14 nMであり、<sup>125</sup>I-H<sub>c</sub>/Cのラット脳シナプトソームへの結合を阻害するために、H<sub>c</sub>/Cと同程度の濃度が必要であった。W1257F、G1270A、H1283A、H1283EのIC<sub>50</sub>は151~448 nMで、H<sub>c</sub>/Cに比べて7倍以上高い濃度が必要であった。W1257A、Y1258Aは<sup>125</sup>I-H<sub>c</sub>/Cのシナプトソームへの結合を阻害しなかった。

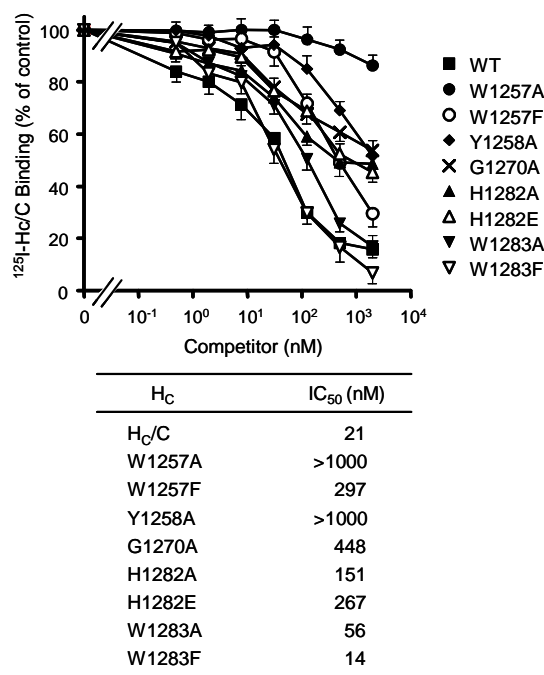


図2. C型点変異体の結合活性

D型毒素産生菌である1873株とC/Dモザイク毒素産生菌である003-9株のH<sub>c</sub>領域は92%の相同性を持ち、PEとの結合活性は003-9株由来の方が数十倍高い。両者ともPEに結合すること、ガングリオシド結合モチーフが保存されていないことから、結合に関与する部位を調べるための指標となるアミノ酸残基が推測できなかったため、H<sub>c</sub>/D<sub>1</sub>とH<sub>c</sub>/D<sub>2</sub>のキ

メラ体を作製し受容体認識領域の検索に用いた。H<sub>C</sub>/D<sub>2</sub>のC末端領域をH<sub>C</sub>/D<sub>1</sub>の配列に置換したキメラ体4つ(H<sub>C</sub>/DD1~H<sub>C</sub>/DD4)を作製した。ラット脳シナプトソームに対する結合阻害実験を行い、未標識H<sub>C</sub>/D<sub>1</sub>およびH<sub>C</sub>/D<sub>2</sub>、DDキメラ体のIC<sub>50</sub>を算出した(図3)。

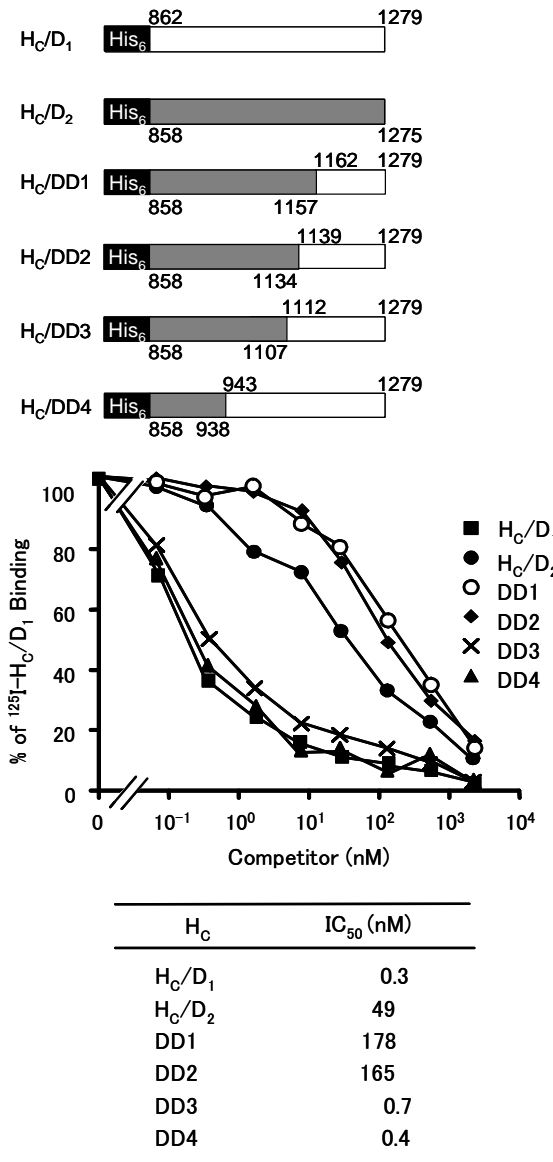


図3. DDキメラ変異体の結合活性

未標識H<sub>C</sub>/D<sub>1</sub>のIC<sub>50</sub>は0.3 nM、未標識H<sub>C</sub>/D<sub>2</sub>のIC<sub>50</sub>は49 nMであった。H<sub>C</sub>/DD1、H<sub>C</sub>/DD2のEC<sub>50</sub>はそれぞれ178 nM、165 nMで、H<sub>C</sub>/D<sub>2</sub>よりも結合活性が低下していた。一方H<sub>C</sub>/DD3ではIC<sub>50</sub>が0.7 nM、H<sub>C</sub>/DD4では0.4 nMであり、H<sub>C</sub>/D<sub>1</sub>と同程度の濃度で<sup>125</sup>I-H<sub>C</sub>/003-9のラット脳シナプトソームへの結合を阻害した。以上の成績よりH<sub>C</sub>/DD2とH<sub>C</sub>/DD3のオーバー

ラップする領域が受容体との結合に関与していることが示された。さらにこの領域内で結合に関与するアミノ酸残基を特定するために、点変異体を作製し、結合阻害実験を行った結果、H<sub>C</sub>/D<sub>1</sub>の点変異体K1135G、K1117Eの結合活性が低下していた。これらの結果から、H<sub>C</sub>/D<sub>1</sub>分子内の1117番目と1135番目のリジンが結合親和性に関与していることが示された。

本研究により、ボツリヌスC型およびD型神経毒素は他の型とは異なる受容体認識様式を有することが示された。今後、毒素分子内の受容体結合領域の構造を明らかにし、毒素-受容体間の分子間結合について、さらに詳細な検討を加える予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T. and Kozaki, S. (2008) Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. *Microb Pathog.* 44, 484-493、査読有
- ② Tsuji, T., Shimizu, T., Sasaki, K., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Taniguchi, K., Noda, M., Neri, P. and Mori, H. (2008) A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. *Vaccine.* 26, 2092-2099、査読有
- ③ Tsuji, T., Shimizu, T., Sasaki, K., Shimizu, Y., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Sugiyama, S., Taniguchi, K., Neri, P. and Mori, H. (2008) Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine.* 26, 469-476、査読有
- ④ Arimitsu, H., Sakaguchi, Y., Lee, J. C., Ochi, S., Tsukamoto, K., Yamamoto, Y., Ma, S., Tsuji, T. and Oguma, K. (2008) Molecular properties of each subcomponent in *Clostridium botulinum* type B haemagglutinin complex. *Microb Pathog.* 45, 142-149、査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 塚本健太郎、ボツリヌスD型神経毒素とPhosphatidylethanolamineの相互作用の解析、第82回日本細菌学会総会、2009年3月14日、愛知県

- ②塚本健太郎、ボツリヌス神経毒素受容体としての糖脂質およびリン脂質の役割、第45回日本細菌学会中部支部総会、2008年10月18日、石川県
- ③塚本健太郎、Surface plasmon resonance analysis of botulinum neurotoxin binding for lipid receptors、TOXINS2008、2008年6月13日、イタリア
- ④塚本健太郎、表面プラズモン共鳴を用いたボツリヌス神経毒素と受容体の結合解析、第81回日本細菌学会総会、2008年3月24日、京都府
- ⑤塚本健太郎、ボツリヌスC、D型神経毒素と脂質分子の多様な結合性について、第54回毒素シンポジウム、2007年9月6日、大阪府
- ⑥塚本健太郎、Mutational analysis of botulinum neurotoxintype C and D for determination of receptor-binding site、第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2007年9月2日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚本 健太郎 (TSUKAMOTO KENTARO)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：80434596