

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780220
 研究課題名（和文）
 シナプトタグミンⅡ発現神経様細胞を用いたボツリヌス B 型神経毒素の作用機構の解明
 研究課題名（英文）
 Functional analysis of synaptotagmin II as a receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin expressed neuroendocrine-like cells
 研究代表者
 幸田 知子 （ KOHDA TOMOKO ）
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
 研究者番号：80336809

研究成果の概要（和文）：高親和性受容体タンパクであるシナプトタグミンⅡ（StgII）を PC12 細胞にトランスフェクションし BoNT/B に感受性のある PC12 細胞を確立した。StgII 発現 PC12 細胞は BoNT/B 処理により基質である VAMP2 を切断した。また StgII 発現 PC12 細胞に ganglioside を添加すると BoNT/B の作用が増強された。ganglioside を添加した PC12 細胞は BoNT/B 処理により VAMP2 が切断され、StgI 欠損 PC12 細胞に StgII 遺伝子を発現すると、VAMP2 が切断された。StgI は ganglioside 存在下、StgII は単独で BoNT/B の受容体として機能することが分かった。

研究成果の概要（英文）：We generated StgII expressed PC12 cells transiently and applied to understand more precisely how BoNT/B recognizes the receptor and enters neurons. The functional entry of BoNT/B was determined by monitoring VAMP2 amount in the cells. We examined the role of ganglioside, StgII-expressing cells were treated with ganglioside exogenously. The sensitivity of the cells was higher than of non-treated cells. These results support the notion that StgII and ganglioside cooperate to play a role in BoNT/B receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・応用獣医学

キーワード：ボツリヌス神経毒素、受容体、シナプトタグミン、PC12 細胞

1. 研究開始当初の背景

| ボツリヌス毒素の作用発現には、これま

で型特異性を決定する受容体タンパク質と特定のガングリオシドの複合体と毒素の結合が必要であると考えられてきた。最近、毒素受容体の検索と機能解析が次々に行われ、B型神経毒素(BoNT/B)はシナプトタグミン(Stg)IまたはStgIIのシナプス小胞内腔に突出したN末端領域とガングリオシドGT1bまたはGD1aの複合体であること、BoNT/AはSV2(synaptic vesicle protein 2)のシナプス小胞内腔に突出した領域であること、BoNT/GはStgIまたはStgII単独と結合が可能であることが報告されている。またBoNT/CはガングリオシドGT1bまたはGD1a、BoNT/Dの受容体は磷脂質フォスファチジルエタノールアミンであることも明らかになっている。申請者はBoNT/BのH_c領域の点変異体を用いて受容体結合部位を調べ、ガングリオシドGT1bとの結合に関与するアミノ酸残基は1261残基のトリプトファンを中心とした広範囲にわたり、StgII/ガングリオシドGT1b複合体を認識するアミノ酸残基は、これよりも限局した部位であることを見出した。また受容体結合部位のうち、StgII/ガングリオシドGT1b複合体を認識するアミノ酸残基のみがBoNT/Bの毒性発現に深く関わっている知見を得ている。ガングリオシドは神経細胞表面に広く存在し、受容体タンパク質と同様に毒素受容体として必須な成分であると考えられている。これまでの報告からガングリオシド(GM2/GD2)合成酵素欠損マウスはBoNT/A、BoNT/B、破傷風毒素に高い耐性を示し、共結晶構造解析によりBoNT/A、BoNT/B、破傷風毒素とガングリオシド結合部位の存在が予想されている。またStgII N末端領域とBoNT/Bの共結晶構造解析が行われ、BoNT/BのガングリオシドとStgIIの結合部位は一致しないことが明らかになっている。しかし、BoNT/A、BoNT/Gは受容体タンパク質単独でも毒素に結合するが、ガングリオシド存在下で結合が増強される傾向があること、BoNT/CやBoNT/Dの受容体はタンパク質以外のガングリオシドや磷脂質であることが明らかになり、BoNTは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することがわかってきた。

BoNTの毒性発現機構を調べるために使用できる株化細胞はなく、通常神経の初代培養細胞が用いられる。BoNTに感受性のある株化神経細胞を確立することは、受容体成分とBoNTとの毒性発現機構の解析には不可欠であるため、BoNT/Bの高親和性受容体タンパクであるStgII発現神経細胞の作製を試みた。PC12細胞は15種類のStgアイソフォームのうち、StgI、StgIXとStgIVが発現し、NGFに反応して神経様に分化するため、伝達物質の開口放出の機構解明に

利用されているが、BoNT/Bには感受性はない。

2. 研究の目的

本研究では、BoNT/Bに感受性のあるPC12細胞を確立し、毒素の細胞内侵入・移行、毒性発現機構における受容体タンパク質StgIおよびStgIIとガングリオシドの果たす機能的な役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BoNT/B感受性StgII発現PC12細胞の作製

StgII遺伝子全長(aa:442)をpENTR/D-TOPO(invitrogen)にクローニング後、LR反応によりGatewayディステーションベクター(pcDNA 3.2/V5-DEST)に移入し(StgII/pcDNA3.2/V5-DEST)を作製した。PC12細胞へのDNAのトランスフェクションにはLipofectamine 2000(invitrogen)を用いた。12穴プレートにPC12細胞(2 x 10⁵/ml/well)をまいた翌日、Opti-MEMで希釈したDNA(1.6 μg)と4 μlのLipofectamine 2000を混合し、室温で20分間静置後、PC12細胞に複合体を添加し、4時間後、培地交換を行い、18-24時間後にアッセイを行った。PC12細胞のStgII発現はimmunoblotと免疫染色により行った。StgI欠損PC12細胞(StgI⁻PC12:北里大学高橋正身教授より分与)についても同様の処理を行いStgII発現StgI⁻PC12を得た。

(2) StgII発現PC12細胞に対するBoNT/B及びガングリオシドの作用

StgII発現PC12細胞およびStgI⁻PC12細胞をPBSで2回洗った後、High K⁺ solution (50 mM KCl, 80 mM NaCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM glucose, pH7.4)に交換し、各濃度のBoNT/Bを室温で15分間反応させた。反応後、BoNT/Bを取り除き、Complete medium (RPMI-1640, 5% FCS, 5% HS, 50 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin)に交換し、37°C 18時間後、細胞内基質であるVAMP2切断の程度をimmunoblotで解析した。

ガングリオシドとの反応にはGanglioside Mixture (Calbiochem)を用い、BoNT/Bと反応させる前日、Serum free medium (RPMI-1640, 50 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin)で25 μg NeuAc/mlとなるように希釈し、PC12細胞に添加し、37°C一晩処理した。

4. 研究成果

(1) PC12細胞およびStgI⁻PC12細胞でのStgIIの発現

StgIIを移入したpcDNA 3.2/V5-DESTをトランスフェクションしたPC12細胞およびStgI⁻PC12細胞を集めて、lysis

buffer (PBS-0.5% Triton X-100, 0.05% SDS, Protease inhibitor) に懸濁し、SDS-PAGE 後 StgI 認識 mAb および StgII 認識 pAb を用いて Immunoblotting を行った。陽性コントロールとして Rat P2 分画を用い、StgII 遺伝子をトランスフェクションしない PC12 細胞および StgI⁻PC12 細胞についても同様に調べた。また StgII 発現 PC12 細胞および StgI⁻PC12 細胞を 4%パラフォルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton-X100 で permeabilization し、StgII 認識 pAb を用いて免疫染色を行った。Immunoblotting により Rat P2 分画は StgI と StgII 両方が発現し、PC12 細胞は StgI のみ、StgI⁻PC12 細胞は StgI と StgII ともに発現していないことを確認した。PC12 細胞および StgI⁻PC12 細胞は Lipofectamine 2000 を用いた遺伝子導入方法により、StgII 全長が発現し、その分子量は陽性コントロールと同じ約 65 kDa であった (図 1A)。

StgII 認識 pAb を用いて免疫染色を行った。StgI⁻PC12 細胞に比べて PC12 細胞は StgII 発現効率は低い、PC12 細胞および StgI⁻PC12 細胞はともに StgII の特異蛍光が観察された (図 1B)。

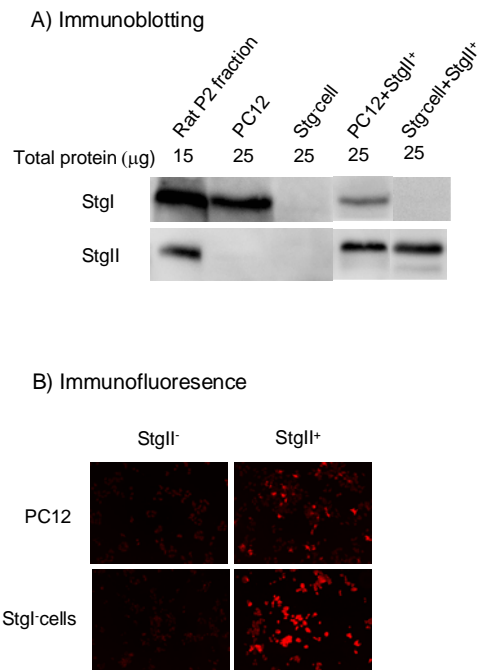


図1. StgII発現PC12およびStgI⁻ cell

(2) StgII 発現 PC12 細胞および StgI⁻PC12 細胞の BoNT/B に対する効果

各濃度に希釈した BoNT/B およびガングリオシドを添加した後、BoNT/B を StgII 発現 PC12 細胞および StgI⁻PC12 細胞に作用させ、VAMP2 の切断の程度を比較した。BoNT/B

未処理の VAMP2 の density を 100%とし、b-actin を内部標準とした。StgI⁻PC12 細胞に StgII を発現した場合、BoNT/B による VAMP2 の切断の程度はガングリオシド添加、未添加でも差はほとんどなかったことから、StgII 単独でも受容体になり得ることがわかった (図 2A)。しかし、StgI のみが発現している PC12 細胞 (野生型) は高濃度で BoNT/B 処理した場合、VAMP2 の切断がみられ、ガングリオシド添加後 BoNT/B 処理すると VAMP2 の切断の程度が高くなったことから、StgI 単独では受容体にはなり得ないが、ガングリオシド存在下では BoNT/B の受容体になると考えられた。また、StgII 発現 PC12 細胞を BoNT/B 処理した場合、ガングリオシドを添加した方が VAMP2 の切断の程度が高いことから、BoNT/B の受容体構成要素として StgI、StgII およびガングリオシドが存在する場合、最も感度が高いことが明らかになった (図 2B)。

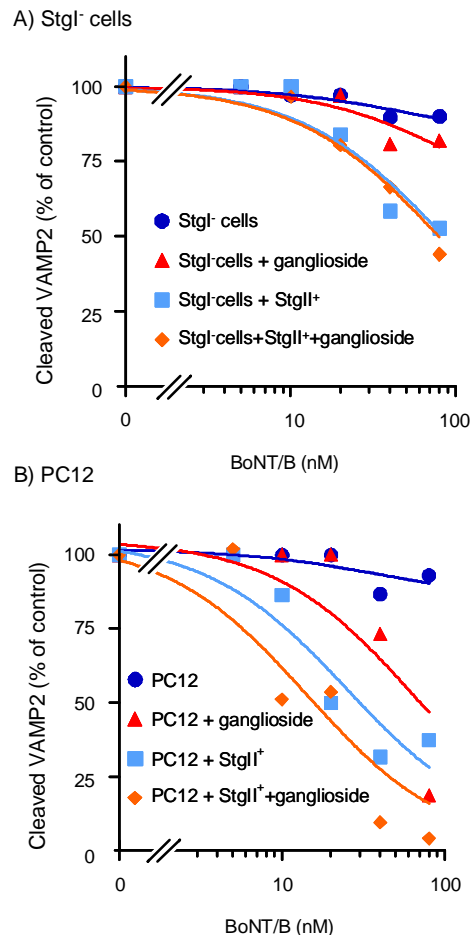


図2. BoNT/BによるVAMP2の切断

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1件)

- 1) Nakamura, K., T. Kohda, K. Umeda, H. Yamamoto, M. Mukamoto, and S. Kozaki. 2010. Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. *Vet. Microbiol.* 140: 147-154(2010). 査読有

[学会発表] (計2件)

- 1) 幸田ら, “Toxic action of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin with synaptotagminII expressing PC12 cells” 第87回日本細菌学会総会, 横浜, 3月27-29日, 2010
- 2) 幸田ら, “Functional analysis of synaptotagmin II as a receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin”, 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 兵庫, 9月7-11日, 2008

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幸田 知子 (KOHDA TOMOKO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：80336809