

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790430

研究課題名（和文） 新規受容体 PE を介したボツリヌス D 型神経毒素の細胞内侵入機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of PE as a novel receptor for botulinum neurotoxin type D

研究代表者

塚本 健太郎（TSUKAMOTO KENTARO）

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：80434596

研究成果の概要（和文）：ボツリヌス D 型神経毒素は phosphatidylethanolamine（PE）に結合するが、実際 PE を介して細胞内に侵入し、毒性を発現させているのかどうかについては明らかにされていない。そこで本研究では、毒素の細胞内侵入機構を調べるため、毒素受容体結合領域の結晶構造を明らかにし、さらに神経分化させたマウス胚性腫瘍細胞株 P19 が本毒素に高感受性であることを見出し、毒素の作用機序解明に有用であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Botulinum neurotoxin type D possesses binding activity to phosphatidylethanolamine (PE), however, it is not unclear whether PE could mediate the internalization of the toxin into neuronal cells. In this study, we determined crystal structure of the receptor binding domain of the toxin. Moreover, we found that mouse embryonic carcinoma P19 cells exhibited high sensitivity to botulinum neurotoxin type C and D/C mosaic toxin, thus making them a novel susceptible cell line for research into botulinum neurotoxins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性・細菌毒素

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス神経毒素はシナプス前膜の存在する受容体を認識し、結合する。我々はこれまで、ボツリヌス毒素の毒性発現機構について研究を行い、以下の成果を挙げてきた。(1)ボツリヌス C 型毒素は他の型よりも毒作用のガングリオシド依存性が高く、一方 D 型毒素については新たな受容体として PE 発見した(Tsukamoto 2005. *J Biol Chem*)。 (2)ボ

ツリヌス C 型毒素および D 型毒素の受容体結合に関わるアミノ酸残基を同定し、特に D 型については、非常に特殊な残基が結合に関与していることを見出した (Tsukamoto 2008. *Microb Pathog*)。 (3)ボツリヌス C 型および D 型毒素の受容体認識領域 (Hc) の組換え体と受容体含有リボソームを用いて、SPR を利用した新たな結合解析実験系を確立した。

毒素受容体に関しては多くの研究がなされたが、各毒素型によって異なる細胞内侵入機構については未だ解明に至っていない。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、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。しかしながら、PE は全ての細胞に存在する脂質分子であり、細胞膜の内層に多く存在しているため、どのようにして D 型毒素が認識し、神経特異的な毒作用を発現させているのか、全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) は血清学的に A から G 型に分類されており、いずれの型も末梢神経終末に作用し、弛緩性麻痺を引き起こす。本毒素は分子量約 150kDa の蛋白質毒素であり、C 末端の Hc 領域が神経細胞膜上の受容体に結合し、細胞内に侵入後、N 末端領域の軽鎖が小胞の膜融合に関わる SNARE 蛋白質群を切断し、開口放出を阻害する。毒素受容体は毒素型特異的な蛋白質成分と型間で共通したガングリオシドの二成分から成ると考えられてきた。実際、A 型毒素では SV2 (synaptic vesicle protein 2)、B 型毒素では Synaptotagmin I, II といった小胞膜蛋白質が受容体成分として同定されている。また、最近、E, F 型毒素も SV2 を受容体として認識することが報告されており、毒素型によって必ずしも異なる分子を認識するものではないことが徐々に明らかになってきた。一方、我々はこれまで C 型および D 型毒素について受容体解析を行ってきた。その結果、C 型毒素はガングリオシド GD1b, GT1b に、D 型毒素はホスファチジルエタノールアミン (PE) に結合することを見出した。これらの結合は蛋白質成分の介在無しに見られることから、先に述べた A, B, E, F 型毒素とは異なった受容体認識機構、結合様式を有していると考えられる。

本研究では、C 型および D 型毒素の受容体認識機構を明確にし、毒素のもつ神経特異的作用との関連を明らかにするため、C 型および D 型 Hc の結晶構造解析を試みた。また、一方で、我々はこれまで最もよく用いられてきた初代培養神経細胞に替わる毒素に感受性を示す新たな細胞株を探索するため、胚性腫瘍由来の P19 細胞に着目した。本細胞は、胚性幹細胞の性質をもち、多分化能を示す。神経細胞に分化誘導することが可能であり、P19 由来の神経細胞は初代培養に極めて遺伝子発現を示すことが知られている。この P19 細胞が本毒素に感受性があるかどうかを調

べ、神経特異的な毒作用を研究する上での有用性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 菌株及び毒素：C 型毒素 (BoNT/C) 産生性ボツリヌス菌 (CB-19 株) および DC モザイク毒素 (BoNT/DC) 産生性ボツリヌス菌 (OFD05 株) 由来の神経毒素および本毒素の受容体結合ドメインのリコンビナント蛋白質を使用した。

(2) C 型および D 型に分類される 4 種の Hc について結晶構造と結合特異性についての解析を試みた。4 種の Hc のうち、DC モザイク毒素由来の OFD05Hc の立体構造を Se-SAD 法にて 2.8 Å の分解能で決定した。

(3) P19 細胞の培養：α-MEM で継代培養したマウス胚性がん細胞由来の P19 細胞をレンチノイン酸で処理し、神経への分化誘導を行った。分化誘導した細胞は Neurobasal medium で維持し、4 日目に毒素処理および Hc 処理をして、実験に用いた。

(4) P19 細胞の毒素感受性：P19 細胞をボツリヌス毒素で処理し、毒素の細胞内基質である SNARE 蛋白質群 (BoNT/C は Syntaxin、BoNT/DC は VAMP-2) の切断の有無をウェスタンブロッティングで調べた。

(5) Hc の細胞内局在性の解析：P19 細胞に侵入したリコンビナント Hc の局在性について、蛍光免疫染色を用いて検討した。Hc の抗体はウサギのポリクローナル抗体を用い、二次抗体として Alexa488 標識抗体を用いて、免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて、Hc の細胞内局在を観察した。細胞内 Hc の蛍光強度は ZEN2009 ソフトウェアを用いて解析した。また、分化誘導後の P19 細胞を、グリコシルセラミド合成阻害剤である PPMP で処理し、ガングリオシド合成を阻害した細胞、さらにその細胞に GT1b、GD1b あるいは GM1a を添加した細胞を作製し、Hc の細胞内取り込みについて変化の有無を調べることで、毒作用発現におけるガングリオシドの役割についても検討を加えた。

4. 研究成果

4 種の Hc のうち、DC モザイク毒素由来の OFD05Hc の立体構造を Se-SAD 法にて 2.8 Å の分解能で決定した。しかし、N 末端ドメインのフレキシビリティが高く、良好なモデルを構築することが出来なかった。そこで、N, C 末端の各ドメインを別々に調製し、それぞれの構造を分子置換法により決定した上、これらの構造を上記の Hc の構造に重ね合わせることで、全体構造を構築した (図 1)。明らかになった構造を機知のボツリヌス毒素の Hc と比較したところ、本 Hc には特徴的な長いループ領域の存在が確認された。このループには硫酸イオンが結合して

おり、機能発現における重要性が示唆された。また、他のボツリヌス毒素と同様に C 末端領域にはポケット構造が存在していた。次に、立体構造をもとに 31 種類の Ala 残基置換体とループ領域の欠失変異体を作製し、その受容体結合活性を表面プラズモン共鳴と培養細胞への結合アッセイにより評価した。その結果、ループ領域とポケット周辺への変異導入により、結合活性が著しく減少することが明らかになった。更に、ガングリオシド中に含まれる Sialyllactose との複合体の結晶構造を 3.4 Å の分解能で決定した。明らかになった構造において、単糖分子の電子密度が上記のポケット中に確認された。この部位は、他のボツリヌス毒素においてもガングリオシド結合ポケットとして機能することが報告されており、OFD05Hc においても同様の機構によりガングリオシドを認識することが示唆された。このことは、変異体解析の結果からも強く裏付けられる。一方、長いループ周辺には有意な電子密度は確認されず、このループが直接ガングリオシドを認識しているかどうか明らかにするためには、より詳細な解析が必要と考えられた。以上の成績は、〔雑誌論文〕欄①及び③で発表している。

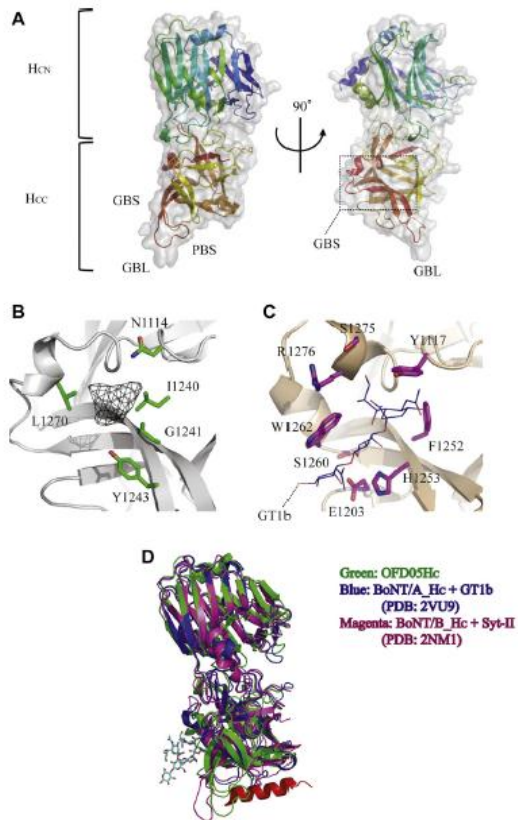


図 1. 今回明らかにした DC モザイク神経毒素受容体結合領域 (OFD05Hc) の結晶構造

一方、P19 細胞の毒素感受性については、

P19 細胞を毒素処理し、基質蛋白の切断をウェスタンブロッティングで確認したところ、BoNT/C 処理では、毒素濃度依存的に Syntaxin の切断が見られ、BoNT/DC 処理では、毒素濃度依存的な VAMP-2 の切断が認められた。また、Hc の細胞内局在性について、P19 細胞内への C 型 Hc および DC モザイク型 Hc の取り込みを検討したところ、両 Hc ともに細胞内に Hc が侵入していることが確認されたが、PPMP 処理した細胞では Hc はほとんど認められなかった。また、PPMP 処理した P19 細胞に対して、GT1b、GD1b を添加すると C 型 Hc の取り込みは回復したが、DC モザイク型 Hc は取り込まれなかった (図 2)。一方、GM1a を添加すると DC モザイク型 Hc が細胞内に認められたが、C 型 Hc は細胞内に侵入しなかった。以上の結果から、神経に分化誘導した P19 細胞は本毒素に感受性があることがわかった。また、BoNT/C および BoNT/DC の毒作用の発現には、それぞれ特異的なガングリオシドへの結合が不可欠であると示唆された。これまで、ボツリヌス毒素の感受性細胞としては、海馬、小脳や脊髄由来の初代培養神経細胞が用いられることが多かったが、今回培養細胞系で新たな感受性細胞を見出すことができた。本研究では、C 型および DC モザイク型毒素について、感受性の検討を行ったが、受容体が既に同定されている A 型、B 型などに対しても本細胞が感受性を有しているかどうか、今後検討を重ねていきたいと考えている。

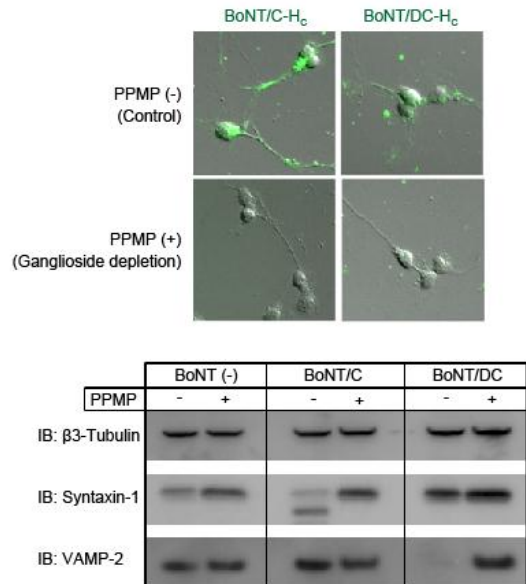


図 2. BoNT/C-Hc 及び BoNT/DC-Hc の P19 細胞内への取りこみ (上) と、毒素処理による基質蛋白の切断 (下)

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5件)

- ① Nuemket N., Tanaka Y., Tsukamoto K., Tsuji T., Nakamura K., Kozaki S., Yao M., Tanaka I. (2011) Structural and mutational analyses of the receptor binding domain of botulinum D/C mosaic neurotoxin: Insight into the ganglioside binding mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol.411, pp433-9. 査読有
- ② Neri P., Shigemori N., Hamada-Tsutsumi S., Tsukamoto K., Arimitsu H., Shimizu T., Akahori Y., Kurosawa Y., Tsuji T. (2011) Single chain variable fragment antibodies against Shiga toxins isolated from a human antibody phage display library. *Vaccine*, Vol.29, pp5340-6. 査読有
- ③ Nuemket N., Tanaka Y., Tsukamoto K., Tsuji T., Nakamura K., Kozaki S., Yao M., Tanaka I. (2010) Preliminary X-ray crystallographic study of the receptor-binding domain of the D/C mosaic neurotoxin from *Clostridium botulinum*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, Vol.66, pp608-10. 査読有
- ④ Ochi S., Shimizu T., Ohtani K., Ichinose Y., Arimitsu H., Tsukamoto K., Kato M., Tsuji T. (2009) Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. *DNA Res*, Vol.16, pp299-309. 査読有
- ⑤ Arimitsu H., Tsukamoto K., Ochi S., Sasaki K., Kato M., Taniguchi K., Oguma K., Tsuji T. (2009) Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, Vol.67, pp96-103. 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 塚本健太郎、胚性腫瘍細胞 P19 を用いたボツリヌス神経毒素の作用機構の解析、第 85 回日本細菌学会総会、2012/3/29、長崎県長崎市
- ② Kentaro Tsukamoto, Structure and activity of receptor binding domain of *Clostridium botulinum* D/C mosaic neurotoxin, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011/9/7, Sapporo, Japan
- ③ 塚本健太郎、ボツリヌス DC モザイク毒素

重鎖 C 末端領域の構造と活性について、第 8 回感染症沖縄フォーラム、2010/02/12、沖縄県宜野湾市

- ④ 西脇啓太、ボツリヌス C 型及び DC モザイク神経毒素は異なるガングリオシドを介して細胞内に侵入する、第 47 回日本細菌学会中部支部総会、2010/10/23、新潟県新潟市
- ⑤ 塚本健太郎、ボツリヌス神経毒素受容体結合領域の結晶構造と細胞内侵入機構の解析、第 57 回トキシシンポジウム、2010/07/15、滋賀県長浜市
- ⑥ 塚本健太郎、EC 細胞を用いたボツリヌス神経毒素重鎖 C 末端領域の機能解析、第 46 回日本細菌学会中部支部総会、2009/10/23、愛知県名古屋市
- ⑦ 塚本健太郎、ボツリヌス神経毒素の脂質受容体に対する結合活性の解析、第 41 回藤田学園医学会、2009/10/02、愛知県豊明市
- ⑧ 塚本健太郎、ボツリヌス神経毒素重鎖 C 末端領域の脂質受容体に対する結合活性、第 56 回トキシシンポジウム、2009/08/26、岐阜県岐阜市

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・講師

研究者番号：80434596