大阪公立大学
Osaka Metropolitan University
学術情報リポジトリ

ボツリヌスB型神経毒素の受容体認識機構に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2015-01-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 幸田, 知子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00000603

大阪府立大学博士（獣医学）学位論文

ボツリヌス B 型神経毒素の受容体認識機構に関する研究

幸田　知子

2011 年

目　　次

緒論……1

第 1 章　ボツリヌス B 型神経毒素のラット脳シナプトソームへの侵入
Ⅰ．緒言……5
Ⅱ．材料および方法 ……5
Ⅲ．結果……10
Ⅳ．考察……11

第 2 章　ボツリヌス B 型神経毒素の受容体結合部位の同定
Ⅰ．緒言……20
Ⅱ．材料および方法 ……21
Ⅲ．結果……27
Ⅳ．考察……31

第 3 章　シナプトタグミンⅡ発現 PC12 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
Ⅰ．緒言……45
Ⅱ．材料および方法 ……46
Ⅲ．結果……50
Ⅳ．考察……53

総合考察 ……63

結論……67

謝辞……68

参考文献 ……69

緒論

ボツリヌス菌（*Closrtridium botulinum*）の産生する神経毒素はヒトや動物に弛緩性麻痺を引き起こす極めて致死性の高い毒素である。神経毒素は、抗原性の違いにより A から G 型に分類され、毒素型により罹患する動物種が異なる。A, B, E, F 型はヒトのボツリヌス中毒を引き起こし、C, D 型は家畜・家禽のボツリヌス症の原因因子と考えられている。ボツリヌス菌は毒素の血清型以外に、タンパク質や糖分解性、発育至適温度など生化学的な性状により分類され、Ⅰ群には蛋白分解性の A、B および F 型菌、Ⅱ群には蛋白非分解性の B、E および F 型菌、Ⅲ群には C および D 型菌、Ⅳ群には G 型菌が属している。B 型菌はⅠ群とⅡ群に分かれるが、ほとんどの B 型菌は蛋白分解性のⅠ型菌に属する[58, 68]。

すべての型の神経毒素(BoNT：150 kDa)は、無毒成分との複合体として産生され、分子量の違いにより LL 毒素（900 kDa）、L 毒素（500 kDa）、M 毒素（300 kDa）を形成し、菌体が融解する際に放出される。A 型菌は 3 種類の毒素、B・C・D 型菌は L および M 毒素、E・F 型菌は M 毒素、G 型菌は L 毒素を産生する。M 毒素は BoNT と無毒成分、L 毒素は M 毒素と血球凝集素(HA)から構成され、LL 毒素は L 毒素の重合体である。複合体毒素は経口摂取された後、腸管から吸収されて血液により運ばれ、アルカリ条件下で BoNT と無毒成分に解離する[31, 47, 58, 68]と考えられている。腸管から吸収されるメカニズムについてはこれまで不明であったが、最近 B 型複合体毒素を構成する HA が表皮カドヘリンと直接結合し、上皮バリアを破壊し侵入

することが明らかになった。また、HA はヒト・ウシ・マウスの表皮カドヘリンとは結合するが、ラットやニワトリの表皮カドヘリンとは結合せず種特異性があることも明らかになった[67]。複合体毒素は強酸性条件下やプロテアーゼ処理でも安定であることから無毒成分は胃や腸管内で BoNT を保護していると考えられている[58, 68]。

BoNT は毒素型に共通した 3 つのドメイン軽鎖(L:50 kDa)、重鎖 N 末端領域(H_N:50 kDa)、重鎖 C 末端領域(H_C:50 kDa)から構成される(Fig. 1)[41]。BoNT は一本鎖のポリペプチドで産生され、トリプシンなどの蛋白分解酵素により分子内に解裂が起こり、L 鎖と重鎖(H_N+H_C)がジスルフィルド結合した 2 本鎖となる。この毒素分子の構造変化により、毒性が数倍から数百倍に上昇する[35]。BoNT はシナプス前膜に H_C を介して結合し、エンドサイトーシスによりエンドソーム内に侵入後、H^+ポンプの働きにより、酸性条件になったエンドソーム膜に H_N で孔を形成する。メタロエンドペプチダーゼ活性をもつ L 鎖は細胞質内に移行し、神経伝達物質の遊離に関する SNARE(soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)蛋白群の特異部位を切断することにより、神経伝達物質の遊離を阻害し、弛緩性麻痺を引き起こすと考えられている。L 鎖の活性は還元により H 鎖と解離したとき出現する[38]。SNARE 蛋白群のうち、A・E 型は SNAP-25(synaptosomal-associated protein of 25 kDa)、B 型は VAMP(vesicle associated membrane protein) 2、D、F および G 型は VAMP1 と VAMP2、C 型は SNAP-25 とシンタキシンの特異部位を切断する[81]。VAMP はシナプス小胞に、SNAP-25 と Syntaxin はシナプス前膜に存在し、直接神経伝達物質の遊離に関与

していることからBoNTの毒作用の本態が明らかになった [4, 25, 48, 59, 79]。さらにBoNTが神経細胞に特異的な結合をすることから、すべての型の毒素受容体の検索が行われ、B 型神経毒素(BoNT/B)は H_C を介してシナプトタグミン(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 の複合体に結合することが明らかになった[49]。Stg には 13 種類のアイソフォームが存在し、N 末端領域をシナプス小胞内腔に、1 カ所の膜貫通ドメインを介して C 末端領域を細胞質に突出した構造をしている[9, 23, 43, 52, 69, 76]。StgI と StgII の相同性は C 末端領域(88%)よりも N 末端領域(46%)の方が低い。Stg アイソフォーム間では細胞内の局在や発現パターンが異なり、StgI は中枢神経系に多く発現し、StgII は小脳以下の末梢神経系に多く発現している[22,]。BoNT/B に対して StgI は低親和性、StgII は高親和性の結合を示し[50]、他のアイソフォームとは結合しないこともわかっている[14, 55]。BoNT/B と比較的相同性が高い BoNT/G も StgI および StgⅡを受容体として認識する[55, 56]。また BoNT/A、BoNT/E および BoNT/F の BoNT の受容体は 12 回膜貫通ドメインをもつシナプス小胞糖蛋白質（synaptic vesicle protein：SV）2 のシナプス小胞内腔に突出したドメイン 4 領域であること[15, 17, 21]、C 型 BoNT はガングリオシド GT1b または GD1a[75]、D 型 BoNT は燐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た[75]。

このように特異な多様性に富んだ BoNT 受容体は末梢の神経筋接合部だけでなく、中枢神経のシナプスにも存在していることから[1, 2, 78]、BoNT をシナプス伝達の調節・制御に応用することにより医薬品としての利用開発も行われている[11, 26, 45,

74]。

本研究では BoNT/B の詳細な毒性発現機構を解明するために、第 1 章ではシナプトソームを用いて、BoNT/B による神経伝達物質遊離阻害とシナプス小胞蛋白である VAMP2 の切断が密接に関連していることを確認した。またシナプトソーム表面に存在する受容体に結合後、シナプス小胞に取り込まれた BoNT/B の動態について詳細に解析した。第 2 章では BoNT/B の受容体への結合部位をアミノ酸レベルまで解析するために、H_C 領域の点変異体を作製し、点変異体のガングリオシドおよび StgII/ガングリオシド GT1b 複合体への結合活性を調べた。ラット小脳顆粒細胞を用いて、高カリウム溶液による脱分極刺激によるグルタミン酸の遊離を指標に H_C 点変異体と BoNT/B の競合実験を行い、受容体認識に必須な H_C 領域のアミノ酸残基の特定を行った。第 3 章では、Stg 発現株化細胞を用て、BoNT/B の結合および特異基質に対する酵素活性の程度を比較することにより Stg およびガングリオシドが担う BoNT/B 受容体としての機能的役割について調べた。これらの成績を基にして BoNT/B と宿主側の受容体との相互関係を詳細に明らかにした。

第１章　ボツリヌスＢ型神経毒素のラット脳シナプトソームへの侵入

Ⅰ．緒言

シナプトソームはBoNTに対して高い親和性をもつことから、シナプス前膜を含む実験材料として用いられ、脱分極刺激時の BoNT または軽鎖による神経伝達物質放出の阻害活性が確認されてきた[3]。一方、BoNTと直接的な結合を示さないウシクロマフィン細胞のような分泌系細胞は、ジギトニン処理すると BoNT による脱分極刺激時の神経伝達物質放出の阻害活性が確認されること[6, 18]から、BoNT 感受性細胞として開口放出阻害のメカニズムを解明するためのツールとして用いられてきた。BoNT/B は亜鉛依存性プロテアーゼ活性をもち、SNARE 蛋白質の VAMP2 の特異部位を切断することから、神経伝達物質の開口放出に直接作用することが予想された。その後、シナプトソームから精製したシナプス小胞や基質となる SNARE 蛋白群のリコンビナント蛋白の BoNT や L 鎖による切断が調べられてきた[70]。また、BoNT/B の受容体がシナプス小胞蛋白である StgII の N 末端領域とガングリオシド GT1b の複合体であることが明らかになり、BoNT/B は神経伝達物質の開口放出を利用して細胞内に侵入し、細胞内基質蛋白である VAMP2 を切断することが示唆された。本章ではシナプトソームから取り込まれた BoNT/B の動態と基質蛋白である VAMP2 切断について、詳細な検討を行った。

Ⅱ．材料および方法

1. BoNT/B の精製

ボツリヌス B 型菌(Okra 株)の複合体毒素は既報の方法に従い精製した[34]。保存菌株をクックドミート培地(12.5%クックドミート、0.3%グルコース、0.2%可溶化デンプン)で前培養した上清を、PYG 培地(2%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%グルコース、0.025%チオグリコール酸ナトリウム、pH 7.0)で、30℃3 日間静置培養した。酸沈殿、プロタミン処理、陽イオンクロマトグラフィーおよびゲルろ過を行い、複合体毒素(L および M 毒素)を得た。M 毒素を 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.5)に透析後、同緩衝液で平衡化した RESOURCE Q (GE healthcare)に吸着させ、AKTA prime (GE healthcare)を用いて、0～0.3 M NaCl の直線濃度勾配で無毒成分を BoNT から分離し、溶出した。BoNT は 50 mM リン酸緩衝液に置換、濃縮し、使用時まで -80℃で保存した。

2. シナプトソームの調製

Whitaker らの方法[84]に従いラット大脳 P2 分画を調製した。Wister 系ラット 8 週齢の（日本 SLC)の脳を素早く取り出し湿重量を測定後、氷冷した 0.32 M スクロース-5 mM MOPS (3- morpholion-propanesulfonic acid：Dojindo)-NaOH 緩衝液 pH 7.4 を 50 ml 加え、テフロンホモジナイザーを用いて氷中下で軸回転 900 回転/分、軸の上下を 10 回繰り返し磨砕した。ホモジネートに 0.32 M スクロース-5 mM MPOS-水酸化ナトリウム緩衝液 pH 7.4 を 20 ml 加え 8,000 x *g*, 10 分間遠心(Tomy, RS-18FII)し、上清(S1 分画)を回収した。上清をさらに 10,200 x *g* 15 分

間遠心し、その沈渣を同緩衝液に再懸濁し、10,200 x *g* 15 分間遠心したものを粗シナプトソーム(P2 分画)とした(Fig. 2)。

3. BoNT/B によるノルアドレナリンの遊離阻害活性の測定

粗シナプトソームを 95%酸素 5%二酸化炭素混合ガス(太陽酸素)で十分通気した 5 mM HEPES(4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazine-ethanesulfonic acid：Nacalai tesque) 緩衝液(125 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 10 mM glucose, 5 mM KCl_2, 2 mM $CaCl_2$, pH 7.5)に最終濃度が 3 mg/ml になるように再懸濁した。P2 分画の懸濁液に ^{3}H 標識ノルアドレナリン(^{3}H-NA, GE healthcare)を最終濃度が 0.1 μM(1 μCi/ml)になるように加えた。同時に種々の濃度の毒素を加えた後、95%酸素 5%二酸化炭素混合ガスを通気し 37℃で 90 分間穏やかに振とうしながら反応させた。反応後 ^{3}H-NA 処理 P2 分画は、9,000 x *g*, 1 分間遠心し、氷冷した塩化カルシウムを含まない(Ca^{2+}不含)HEPES 緩衝液[Ca^{2+}(-)緩衝液]で再懸濁した。再懸濁した ^{3}H-NA 処理 P2 分画から十分に遊離 ^{3}H-NA を取り除くために 9,000 x *g*, 1 分間の遠心(Hitachi, CR15D)し、次いで Ca^{2+}(-)緩衝液に懸濁する操作を 2 回繰り返した。最後に ^{3}H-NA 処理 P2 分画を 1.3 ml の Ca^{2+}(-)緩衝液に懸濁し 1.5 ml の遠心管に 0.3 ml ずつ分注した。高 K^+溶液で脱分極する場合には最終濃度が 105 mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$, 25 mM KCl になるように調製した HEPES 緩衝液(25 K^+溶液)を 0.6 ml 加えた。対照として最終濃度が 105 mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$, 5 mM KCl になるように調製した HEPES 緩衝液(5K^+

溶液)を 0.6 ml 加えた。

30℃5 分間処理後、9,000 x *g*, 1 分間の遠心を行い、上清中に含まれる放射活性を測定した。遊離 ^{3}H-NA は処理 P2 蛋白量(mg)当たりの放射活性(d. p. m) に換算した後、毒素による ^{3}H-NA 遊離阻害の割合は次の式で計算した [1]。

阻害率(%)={(d)-(c)}/{(b)-(a)} x 100

(a) 毒素未処理 5 K+ (5 min), (b) 毒素未処理 25 K+ (5 min),

(c) 毒素処理 5 K+ (5 min), (d) 毒素処理 25 K+ (5 min)

4. BoNT/B 処理シナプトソームの連続スクロース密度勾配遠心による分画

粗シナプトソーム分画(15 mg/5 ml)に最終濃度 100 nM になるように BoNT/B を加え、95%酸素 5%二酸化炭素混合ガスで通気し、37℃ 90 分間穏やかに振とうしながら、反応させた。反応後 12,000 x *g* 5 分間遠心し、混合ガスで十分通気した HEPES 緩衝液に再懸濁した。さらに同じ操作を 2 回繰り返した後、再遠心し、沈殿を 10 mM スクロース添加 5 mM MOPS-NaOH 緩衝液、pH 7.4 に懸濁した。氷上に 20 分間放置後、続いて 25,000 x *g* 10 分間遠心 (沈渣は粗細胞膜分画:LP1) し、上清を回収した(LS1)。上清は、165,000 x *g* 60 分間遠心(上清は細胞質分画:LS2)し、その沈渣を 0.2 ml の 10 mM スクロース添加 5 mM MOPS-NaOH 緩衝液、pH 7.4 に懸濁(粗シナプス小胞分画:LP2)し、5～30%のスクロース連続密度勾配溶液(5 ml)に 0.1 ml 重層し、150,000 x *g* 2 時間,遠心した。遠心後、遠心管の底から 18 滴ずつ分画し、各分画に含まれる BoNT/B の作用に関わる蛋白の動態について

SDS-PAGE 後 Western blotting により調べた。

5. SDS 電気泳動と Western blotting

SDS 電気泳動は 10%または 12.5%濃度ゲルを用い Laemmli の方法に従った[41]。Western blotting は SDS 電気泳動後、分離された試料をポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜(Immobilon-P, Millipore)に電気転写して固定化し[10]、5%スキムミルク-TBST (25 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.14 M NaCl-0.05% Tween 20)で 1 時間ブロッキングを行った。1 次抗体としてウサギポリクローナル抗体 (pAb)、マウスモノクローナル抗体 (mAb)と室温で 1 時間反応させ、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼまたはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギまたはマウス IgG(Bio-Rad)と室温 1 時間反応させた。発色基質として、ProtoBlot Western blot AP system (Thermo)または化学発光キット(GE healthcare)を用いた。発色したバンドの濃度はデンシトメータ (Shimazu CS-9000)でスキャンし、数値化した。

6. 使用抗体

ウサギ pAb には StgI または II の N 末端 20 残基のペプチド抗体、SNAP-25 の C 末端 11 残基のペプチド抗体、VAMP2 の N 末端 20 残基のペプチド抗体を用い、マウス mAb にはシナプトフィジン、シンタキシン、Na^+/K^+-ATPase（北里大学 高橋正身 教授より分与）を用いた。BoNT/B の H 鎖認識抗体(B17)および L 認識抗体(B101) は、当研究室保存の各ハイブリドーマを接種したマウス腹水からプロテイン A

またはG(GE healthcare)を用いて精製した。

7. その他

毒素量は Lowry らの方法に従って測定し[44]、牛血清アルブミン相当量として示した。各種抗体およびシナプトソーム量は Bradford らの方法で測定し[7]、牛γグロブリン相当量として示した。

Ⅲ. 結果

1. BoNT/B のラット脳シナプトソームに対する効果

^{3}H-NA を取り込ませたシナプトソームに対し、種々の濃度の BoNT/B(～100 nM)は高カリウム溶液の脱分極刺激による ^{3}H-NA 放出量を減少させた。^{3}H-NA 放出量は BoNT/B 未処理を 100%としたとき、100 nM BoNT/B で約 70%に低下した。BoNT/B 処理と未処理のシナプトソームを直接SDS電気泳動し、細胞内基質蛋白である VAMP2 の切断を調べたが差はなかった(Fig. 3)。シナプトソームを低張処理後、低速遠心によって得た上清(S1)から超遠心によって得た粗シナプス小胞分画(LP2)の VAMP2 は BoNT/B 未処理の ^{3}H-NA 放出量を 100%としたとき、100 nM BoNT/B 処理で約 60%に減少していた(Fig. 4)。

2. 粗シナプス小胞分画の連続スクロース密度勾配遠心による解析

VAMP2 の切断が認められた LP2 をさらに連続スクロース密度勾配遠心し、各分画の BoNT/B や SNARE 蛋白群について BoNT/B 処理前後での変化を Western blotting により詳しく調べた。BoNT/B 処理と未処理で VAMP2 以外の SNARE 蛋白群 StgI および II、シナプトフィジン、シンタキシン、SANP-25、Na^+/K^+-ATPase には変化がなかった。シナプス小胞構築蛋白であるシナプトフィジンが豊富に存在するシナプス小胞分画で BoNT/B 処理による VAMP2 切断が最も認められ、この分画に未還元 BoNT/B が顕著に局在していた(Fig. 5)。

3. シナプトソームの各分画における BoNT/B の動態について

BoNT/B 処理(100 nM) したシナプトソームから細胞膜分画(LP1)および細胞質分画(LS2) を調製し、各分画に含まれる BoNT/B を非還元条件下で調べた。LP1 には未還元 BoNT/B と還元され 2 本鎖になった H 鎖と L 鎖が存在した(Fig. 6B)。また濃縮した LS2 には、微量の L 鎖が検出された(Fig. 6A)。Western blotting によって検出された LP1 および LP2 に含まれる BoNT/B のバンド強度をデンシトメーターにより測定した。反応に用いた BoNT/B の量に対し、LP1 および LS2 に含まれる BoNT/B は、それぞれ 0.2%、0.001%であると推測された。

Ⅳ. 考察

本章で得られた BoNT/B によるシナプトソームからの ^{3}H-NA 放出阻害活性は、BoNT/A によるジギトニン処理したアドレナリン作動性クロマフィン細胞でみられた

^{3}H-NE 放出と同程度であった [6]。しかし、初代培養マウス脊髄細胞を高 K^{+}溶液中で BoNT/A 処理し、高 Ca^{2+}溶液刺激により放出される ^{3}H-グリシン放出阻害活性と細胞内基質蛋白 SNAP-25 切断活性の 50%阻害 BoNT/A 濃度はそれぞれ 40 pM と 589 pM であったと報告されている[30]。シナプトソームを用いた BoNT/B による ^{3}H-NA 放出阻害は比較的高濃度の毒素量を要した。BoNT は毒素活性を発揮するために、シナプトソーム上の受容体に結合後、シナプス小胞にある基質まで到達しなければならないが、BoNT は本来末梢神経に作用するため、シナプトソーム膜上には BoNT/B の特異受容体が少ないことが推察された。また、脱分極刺激は結果として BoNT の作用を周辺の神経細胞に波及させることが知られている[64]。培養神経細胞において、高 K^{+}溶液処理は、シナプス小胞の開口放出を促進し、BoNT の特異受容体への結合を促し、少量の毒素量で高い効果を発揮する可能性がある。このため、シナプトソームと培養神経細胞の効果が異なると考えられた。シナプス小胞分画で検出された BoNT/B は主として未還元の毒素であったが、シナプス小胞に侵入した BoNT/B の一部が還元され、遊離された L 鎖がシナプス小胞上の VAMP2 を切断したと考えられた[53]。毒素未処理シナプトソームと BoNT/B を混合して、同一条件下で連続スクロース密度勾配遠心しても BoNT/B はシナプス小胞と挙動を共にしていなかった。これらの結果から、BoNT/B は受容体に結合後、シナプス小胞のリサイクリングを利用して細胞内に侵入することが示唆された。これは BoNT/B 処理したシナプトソームの細胞質分画に L 鎖が検出された結果と一致する。シナプス細胞膜分画に結合していた BoNT には、還元されて 2 本鎖になった BoNT が存在していた。さらに

BoNT/B は細胞膜上で完全には還元されていないことも示した。細胞膜はこの分画に含まれるメルカプト基のため、通常還元条件を提供することが知られている[46]。BoNT/B の一部がこの作用により還元を受け、2 本鎖となったと考えられた。さらに重鎖 N 末端領域が、人工脂質に pH チャネルを形成することが多数報告されている[28, 33, 62]。シナプス小胞膜のプロトンポンプの作用により、小胞内の pH が低下することが、H_C によるチャネル形成の引き金となり、軽鎖が膜外へ露出すると考えられる。一方、H 鎖がシナプス小胞分画にも細胞質分画にも検出されなかったことは、検出限界以下であったかシナプトソーム内で分解された可能性があり、今後検討を要する課題である。

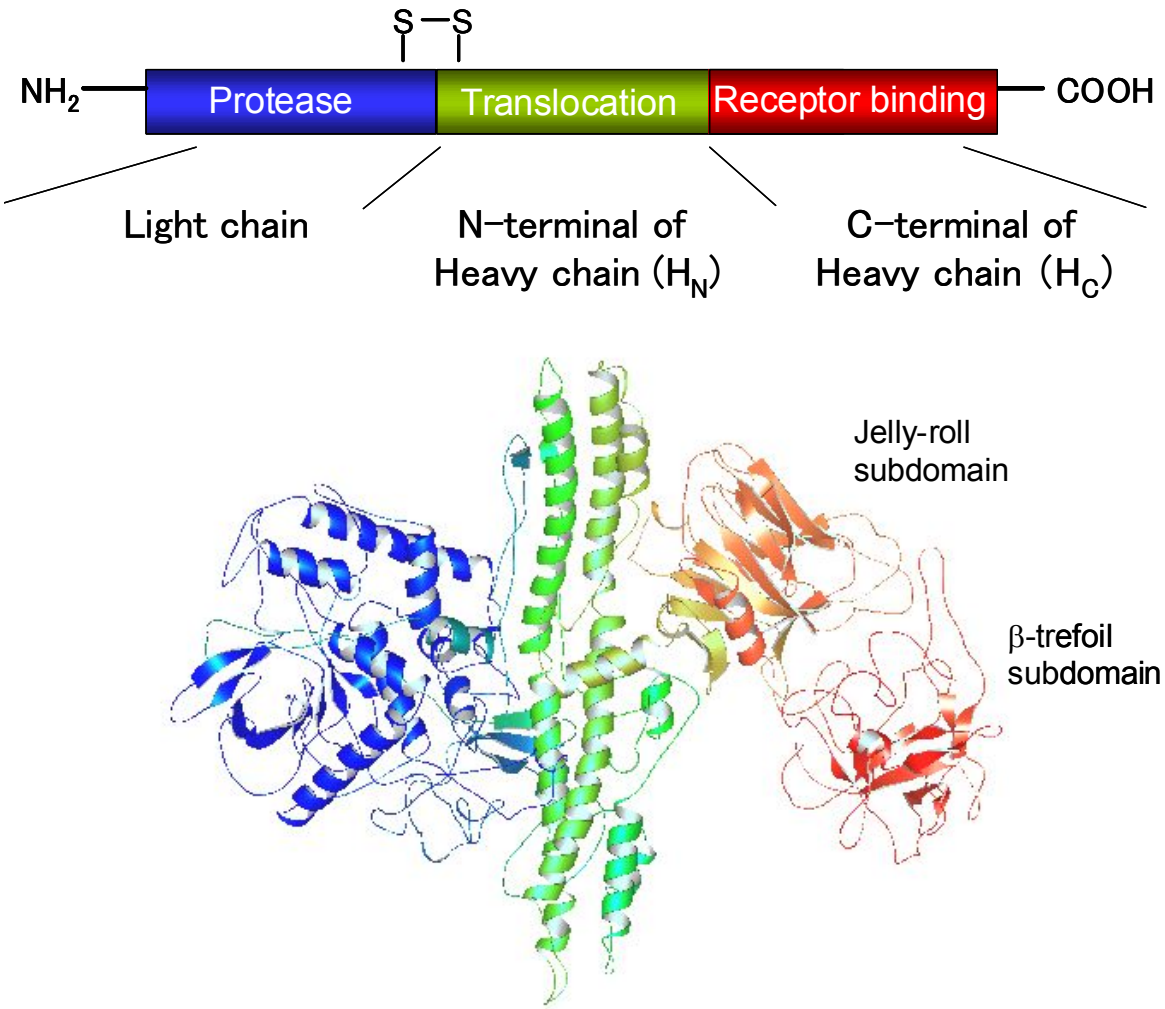

Fig. 1. Schematic diagram and Crystal structure of botulinum neurotoxin type B. The neurotoxin composed of three functional domains

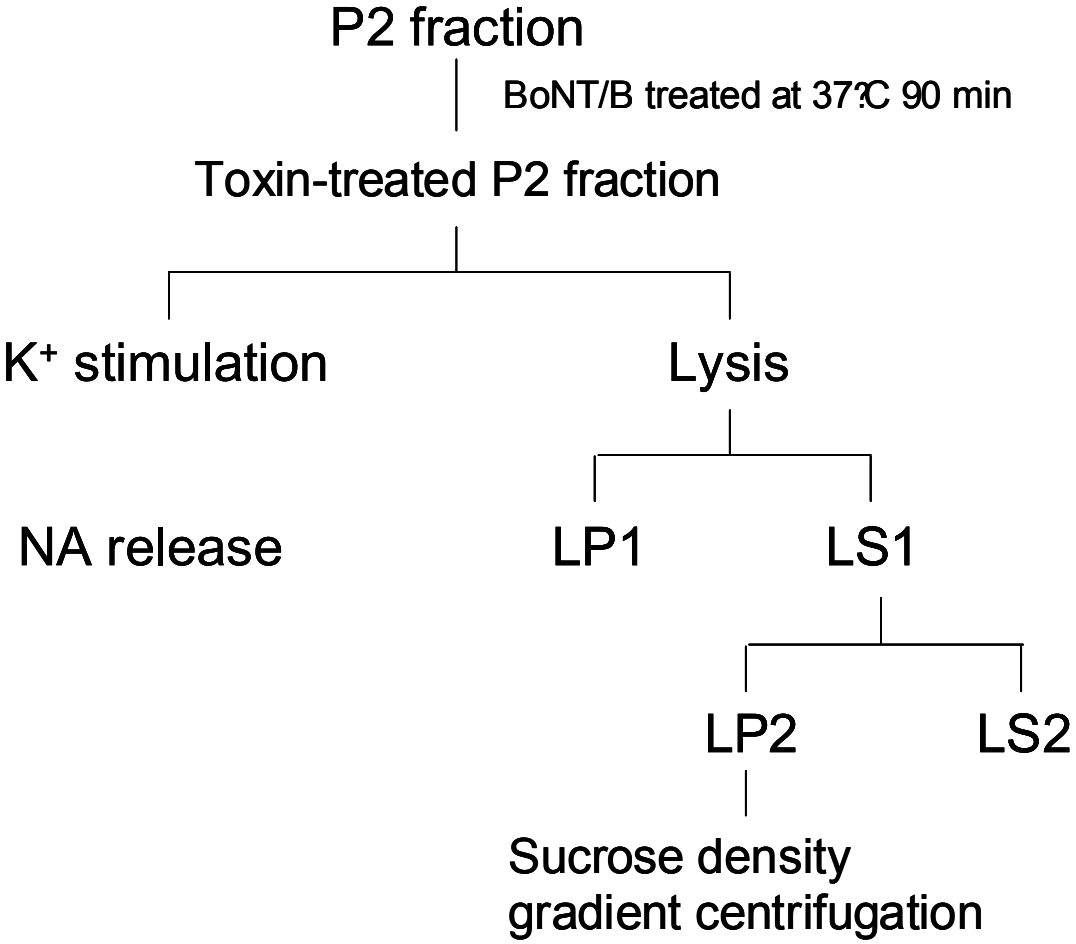

Fig. 2. Treatment of P2 fraction with BoNT/B

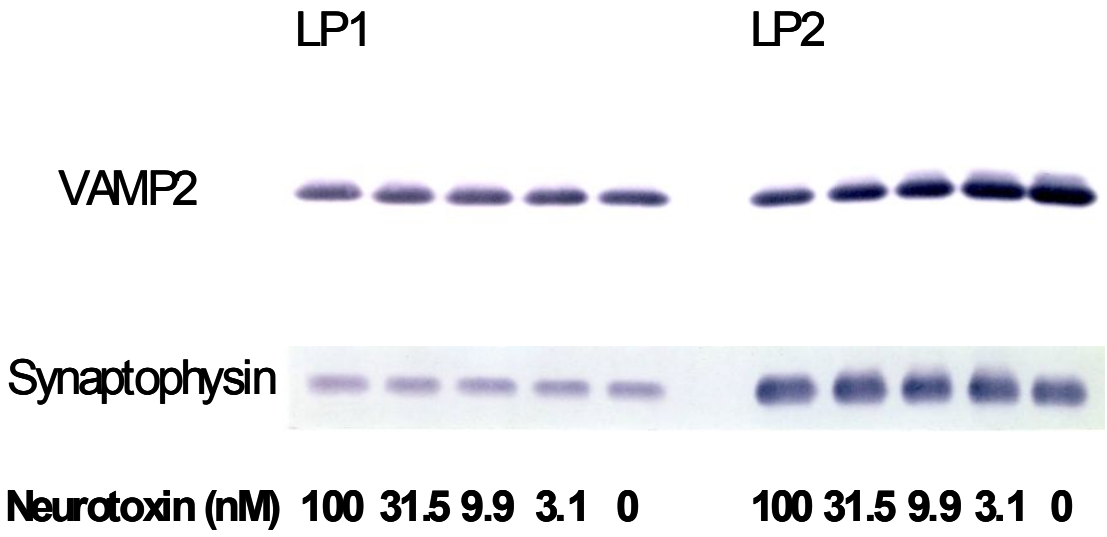

Fig. 3. Effect of BoNT/B on VAMP2 containing LP1 and LP2 fractions

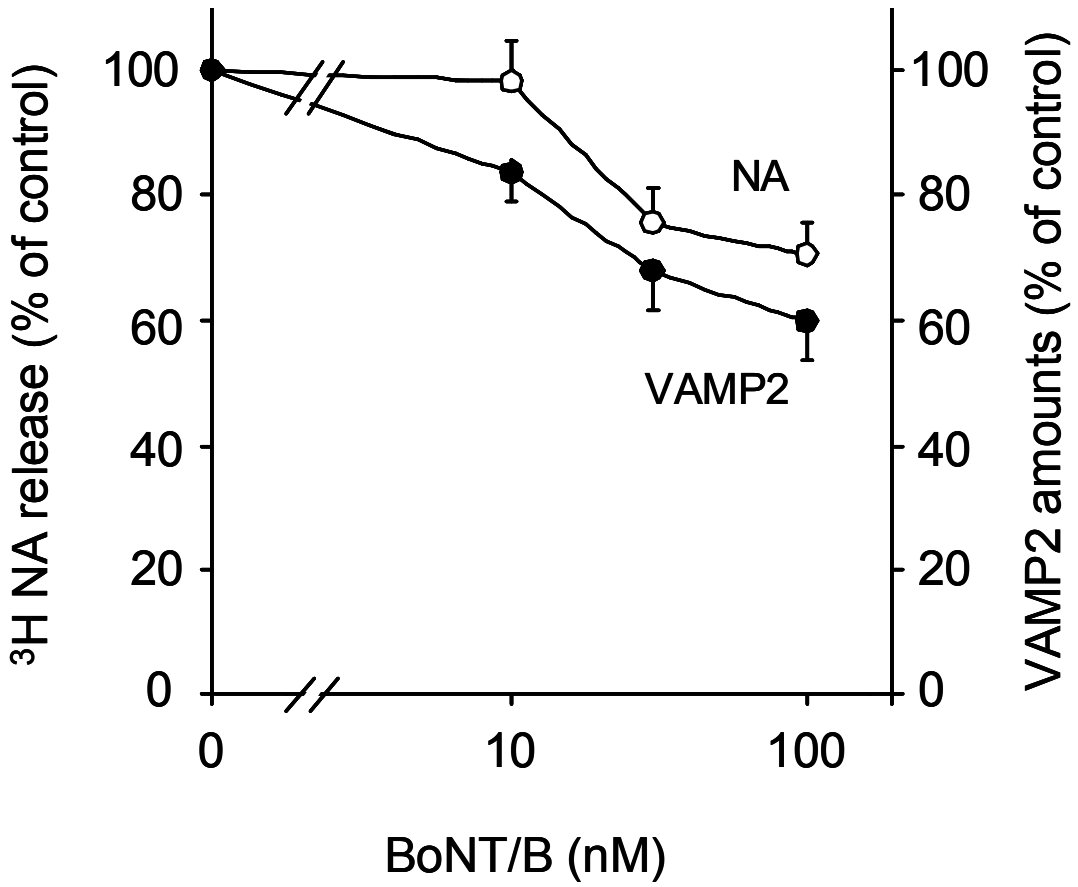

Fig. 4. Effect of BoNT/B on NA release and degradation of VAMP2 in rat brain synaptosomes

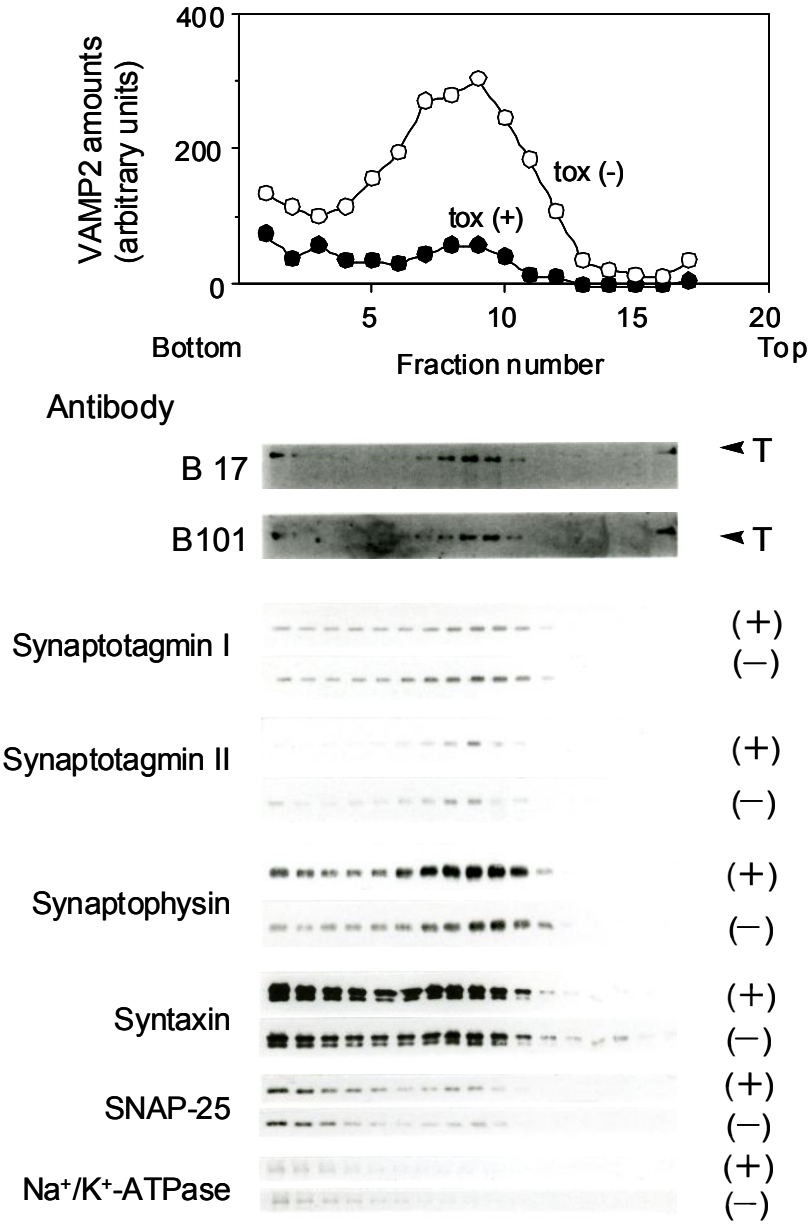

Fig. 5. Sucrose density gradient of crude synaptic vesicles obtained from BoNT/B-treated or -untreated synaptosomes

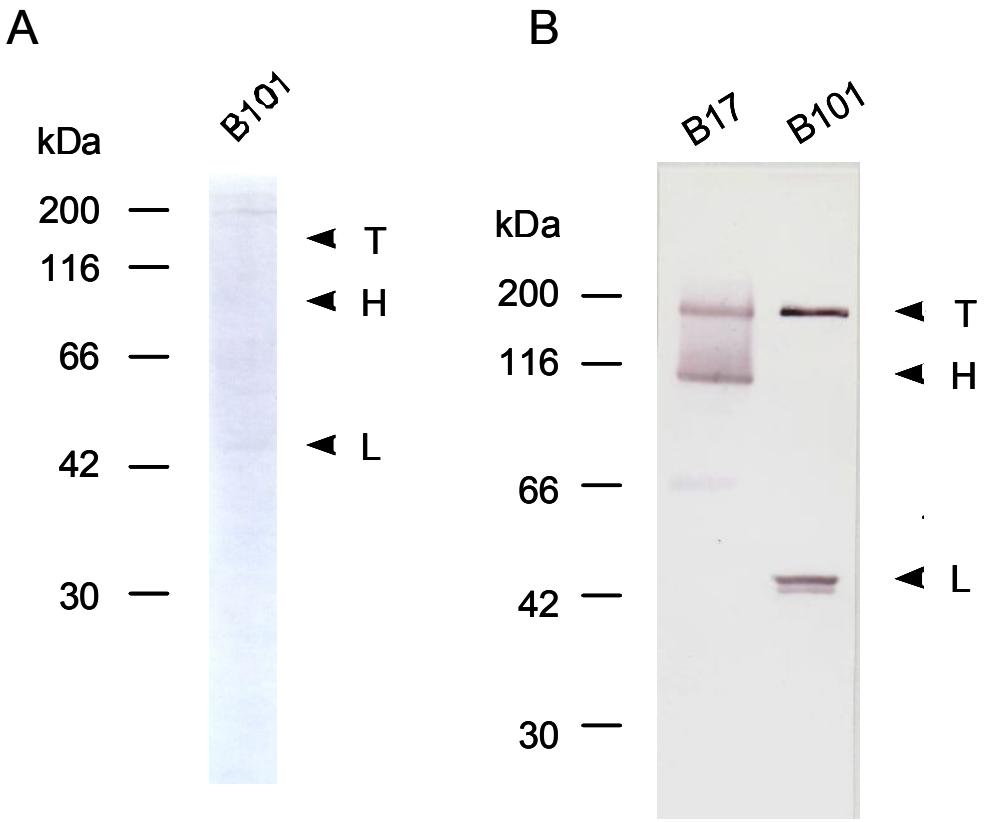

Fig. 6. Detection of light chain in the cytosol fraction (A) and plasma membrane (B) obtained from BoNT/B treated synaptosomes. The positions of molecular mass (kilodaltons) are indicated on the left. The migration positions of BoNT/B (T), the heavy chain (H), and the light chain (L) are shown on the light.

第 2 章　ボツリヌス B 型神経毒素の受容体結合部位の同定

Ⅰ．緒言

BoNT/A および BoNT/B の結晶構造解析により、H_C は N 末端領域(H_{CN})が jelly-roll サブドメイン、C 末端(H_{CC})はβ-trefoil サブドメインから構成されている[40, 72, 73]。ガングリオシドのアナログ、シアルラクトースと BoNT/B との共結晶構造解析により、ガングリオシドとの結合に関与するアミノ酸残基が調べられ[19]、立体構造に基づくアミノ酸配列の比較から BoNT/D を除く、A から G 型 BoNT と破傷風毒素の H_{CC} にガングリオシドが結合するモチーフ(H･･･SxWY)が保存されていることが明らかになった[24, 39, 54, 66]。しかし、ガングリオシドの結合部位のみでは、蛋白成分との複合体を形成した受容体と BoNT/B 分子の結合様式は明らかでない。

本章では Okra 株 H_C の受容体認識部位を結晶構造解析の結果を基に、ガングリオシドと結合する 1261 番目のトリプトファン(W)とその周辺に存在するアミノ酸残基を主にアラニンに置換した単アミノ酸変異型 H_C を作製した。またシアル酸と結合する E1188 周辺でループを形成し、111 株[37, 80]H_C 領域で Okra 株 H_C と異なるアミノ酸残基を主にアラニン置換した単アミノ酸変異型 H_C を作製した。これら 2 つの領域の点変異体のガングリオシド GT1b または StgII/ガングリオシド GT1b 複合体に対する結合活性を比較することにより、BoNT/B 分子の受容体との結合様式を明らかにすることを目的とした。またラット小脳顆粒細胞を用いて、高カリウム溶液による脱分極刺激によるグルタミン酸の遊離を指標に単アミノ酸変異型 H_C と BoNT/B の競合実験を

行い、BoNT/B の毒性発現に関わる BoNT/B の受容体認識部位を特定した。

Ⅱ．材料および方法

1. Okra 株 H_C(Okra/H_C)、111 株 H_C(111/H_C)および Okra 株単アミノ酸変異型 H_C のクローニング

重鎖 C 末端領域(H_C:854～1291 残基)をコードする遺伝子を増幅できるように 5'末端および 3'末端にそれぞれ、*Bam*HI と *Hin*dIII サイトを付加したプライマーを設計した。増幅した DNA を制限酵素 *Bam*HI(New England Biolabs)と *Hin*dIII(TaKaRa)で切断し、同じ制限酵素で切断した pQE30 ベクター(Qiagen)へライゲーションし pQE30/Okra H_C を構築した。pUC18 ベクター(TaKaRa)のマルチクローニングサイトに *Bgl*II サイトと *Not*I サイトを導入した pUC18/ *Bgl*II-*Not*I を作製した。pQE30/Okra H_C から *Bgl*II と *Hin*dIII を用いて H_{CC} 領域(1139～1291 残基)を取り出し、pUC18/ *Bgl*II-*Not*I にライゲーションした(pUC18/H_{CC})。単アミノ酸変異型 H_C の構築には、この pUC18/H_{CC} を鋳型とし、目的とする点変異部位を含むプライマー(Table. 1)を用いて Pfu ポリメラーゼ(STRATAGENE)により、点変異を含んだ DNA を増幅した。PCR は熱変性(95℃5 分間)、30 サイクルの増幅反応(熱変性 95℃ 30 秒間、アニーリング 47℃ 30 秒間、伸張反応 68℃ 7 分間)で実施した。PCR 産物は鋳型プラスミド DNA を分解するために *Dpn*I エンドヌクレアーゼで処理し、大腸菌 JM109 を形質転換後、プラスミドを抽出し、シークエンスを確認した。点変異を確認できた H_{CC} は pUC18/H_{CC} から *Bgl*II、*Hin*dIII で切断し、同酵素で切断し

た発現用ベクターpQE30/Okra H_C にライゲーションを行い、大腸菌を形質転換した。

2. リコンビナント蛋白の発現と精製

pQE30 に挿入された Okra/H_C、1111/H_C および Okra 株 H_C 点変異体遺伝子を含む発現ベクターで(pQE30/Okra H_C、pQE30/111 H_C および pQE30/点変異 Okra H_C) 大腸菌 M15(Qiagen)を形質転換した。発現した各リコンビナント蛋白は Ni-NTA Superflow (Qiagen)を使用しアフィニティー精製した後、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に一晩透析し、CM-Sepharose Fast Flow (GE healthcare)を用いてさらに精製した。リコンビナント蛋白質は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)に再度透析後、使用時まで-80℃で保存した。

3. 円偏光二色性(CD)スペクトルの測定

各リコンビナント H_C を脱気した 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.8) を用いて、0.1 mg/ml に希釈し、で 1 mm 幅キュベットを用い CD スペクトルを測定した(J-720w spectropolarimeter, Jasco)。測定条件は 25℃、波長 185～260 nm、間隔 0.2 nm、速度 50 nm/min、反応時間 2 秒、感度 100 mdeg とし、10 回の平均を結果とした。50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)で行った波形をベースラインとした。モル濃度(2.0×10^{-6}) にアミノ酸残基数をかけたものを濃度(M)とし、リコンビナント H_C の結果からベースラインを引いた各波長の CD スペクトルを J700 標準解析ソフトを用い

てモル楕円率(θ)を算出した[82]。

4. StgII N 末端領域の調製

ラット StgII の膜貫通領域を含む N 末端領域(1～87 残基:Stg2N)を pMAL-c2(New England Biochem)に挿入し、pMAL-c2/Stg2N で大腸菌 DH5α を形質転換した。発現したリコンビナント StgIIN は N 末端領域にマルトース結合蛋白を融合し発現し、(MBP-StgIIN)はアミロースレジン(New England Biochem)でアフィニティー精製を行った。溶出は 10 mM マルトース含有 20 mM トリス塩酸緩衝液(20 mM Tris-200 mM NaCl-1 mM EDTA-1 mM DTT-0.1 mM PMSF-10 mM Maltose, pH 7.4)を用いて行い、MBP-StgIIN 溶出分画には非イオン界面活性剤 MEGA-9 (n-Nonanoyl-N-mrthylglucamide、Dojin)を最終濃度 20 mM になるように添加し、室温に 30 分放置後、100,000 x *g* 60 分間遠心し、上清を回収し使用時まで-80℃で保存した。

5. Okra/H_Cと点変異 Okra/H_Cの受容体への結合

5-1. 再構成リポソームおよびラット脳シナプトソームへの結合

クロラミン-T 法を用いて BoNT/B および Okra/H_Cを $Na^{125}I$(PerkinElmer)で標識した。Schneider らの方法[61]に従い再構成リポソームを作製した。精製 MBP-StgIIN(0.1 mg/ml)に同量のガングリオシド GT1b(50 μg/ml, Sigma.)を加え、さらに 3 mM HEPES 緩衝液(HBS:3 mM Hepes-NaOH (pH 7.4)-120 mM NaCl、

2.5 mM KCl、2 mM $MaCl_2$、2 mM $CaCl_2$)に懸濁したフォスファチジルコリン(10 mg/ml、Sigma)を同量加えた。十分攪拌した後、-20℃に冷却した 2 倍量のアセトンを加え氷上で 2 分間静置し、10,000 x *g* 10 分間-10℃で遠心し、沈渣を 0.1% ウシ血清アルブミン(BSA：Sigma)を含む HBS(HBS-BSA)で再懸濁し、反応に使用した。

96 穴 Microscreen-HA plate (Millipore)を 0.5%BSA を含む HBS で 37℃、30 分間ブロッキングした。吸引ろ過によりブロッキング溶液を取り除き、再構成リポソーム(StgIIN 50 ng/ml、ガングリオシド GT1b 25 ng/ml)またはラット脳シナプトソーム(5 mg/ml)0.1 ml と未標識 Okra/H_C または点変異体 Okra/H_C を添加し 37℃15 分間静置した。さらに ^{125}I-H_C または ^{125}I-BoNT/B(最終濃度 0.5 nM)を加えて 37℃ 30 分間反応後、吸引ろ過により、0.25 ml の氷冷した HBS-BSA でフィルターを 6 回洗浄した。乾燥後、各フィルターを切り抜き、γ-カウンター(Model Cobra 5003, Packard Insturmental Co.)で放射活性を測定した。各点変異体の受容体への結合活性は ^{125}I-H_C との 50%結合阻害濃度(IC_{50})を GraphPad PRISM version 4(GraphPad SOFTOWARE)を用いて算出し、各アミノ酸残基の受容体結合への関与の程度を比較した。

5-2. ガングリオシド GT1b への結合

ガングリオシド GT1b を 1 μg/ml になるようにメタノール(Wako)で希釈し、Multi Well Plate for ELISA H type Plate (Sumitomo Bakelite Co.)に 1 ウエル当たり

50 μl加え、デシケーター内に入れ30分間脱気した後、37℃、30分間静置し、固相化した。0.5%BSA を含む HEPES 緩衝液(3 mM HEPES-NaOH buffer, pH 7.0--120 mM NaCl、2.5 mM KCl、2 mM $MaCl_2$、2 mM $CaCl_2$:HEPES-BSA)で 37℃、1 時間ブロッキングを行った。HEPES 緩衝液で 6 回洗浄し、種々の濃度の未標識 Okra/H_C または点変異体 Okra/H_C と ^{125}I-H_C (最終濃度 1 nM)を加えて 37℃、1 時間反応した。反応液を取り除き、HEPES で 2 回洗浄後、0.1 N NaOH をウエル当たり 0.1 ml 加えた中の 50 μl を回収し、γ-カウンターで放射活性を測定した。

6. ラット小脳顆粒細胞からのグルタミン酸遊離測定

6-1. ラット小脳顆粒細胞の調製

約 8 日齢の Wister ラット系(日本 SLC)の小脳 3-4 匹分を採取し、氷上の 0.1% グルコースを含む PBS(PBSG)に浸した。小脳は実体顕微鏡で毛細血管や軟膜を取り除いた後 50 ml 遠心管に移し替え、ハサミで細かく細切し、10 ml の PBSG を加え静置した。上清を取り除き、沈渣に 5 ml のトリプシン溶液(PBS-1%トリプシン(w/v)-27.8 mM グルコース)を加え 37℃、20 分間振とうした。5 ml の馬血清と 0.025% DNase(w/v)を加え、200 x *g*、5 分間遠心し、上清を取り除いた。沈渣に 10 ml の CF-HBSS-G (12 mM $MgSO_4$-ハンクス平衡塩類溶液-0.25%グルコース)を添加し、室温で 10 分間静置後、200 x *g* 5 分間遠心し、上清を除去した。この操作を 2 回繰り返した後、沈渣に 10 ml の CF-HBSS-G-0.015% DNase (w/v)を加え、ゆる

やかにピペッティングを繰り返した。細胞懸濁液を静置し、2～3 ml の上清をセルストレイナー(70 μm, BD Falcon)に通し、沈渣の細胞塊に 5 ml の CF-HBSS-G を加え、再度ゆるやかなピペッティングを行った後、再度セルストレイナーを通した。10 ml の HK-MEM(MEM-12 mM グルコース-20 mM KH_2PO_4-50 μg/ml ペニシリン-100 μg/ml ストレプトマイシン)を加えて遠心管に残った小脳を回収しセルストレイナーに通した。200 x *g* 5 分間遠心し、上清を除去した。沈渣を 10 ml の HK-MEM-5%FCS でピペッティングし細胞数を計測した。細胞数が 2 x 10^6/ml となるように HK-MEM-5%FCS を加え、1 cm^2 あたり、約 0.4 ml の細胞懸濁液をポリエチレンイミンコーティングした 4 穴プラスティックプレート(Nunc)にまき、37℃、5% CO_2 条件下で一晩培養した。翌日、5 μM Ara-C を含む HK-MEM/B27 培地[MEM-2% B27(Invitrogen)]で 37℃、5% CO_2 条件下で 7 日間培養を行った。

6-2. ラット小脳顆粒細胞に対する BoNT/B のグルタミン酸遊離阻害活性の測定

培養 7 日後のラット小脳顆粒細胞の培地を HK-MEM/B27 培地に替え、1 nM BoNT/B と 500 nM 単アミノ酸変異型 Okra/H_C または Okra/H_C を加え、細胞に添加し、37℃、30 分間反応後させた。反応液を取り除き、細胞を HK-MEM/B27 培地で 2 回洗浄し、37℃、5% CO_2 条件下で 18 時間培養した。脱分極刺激によるグルタミン酸遊離にはあらかじめ 37℃に温めておいた低濃度カリウム溶液(128 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 10 mM glucose, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4)で細胞を 4 回洗浄後、0.4 ml の低濃度

カリウム溶液を添加し 2 分後に回収しベースラインとした。細胞に 0.4 ml の高濃度カリウム溶液(80 mM NaCl, 50 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 10 mM glucose, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4)を添加し 2 分後、回収した。グルタミン酸量を測定は、σ-phtaladephyde (Wako)を誘導体とした逆相クロマトグラフィーを HPLC(FP-2020, Jasco)で行い、蛍光を測定した[20]。

7. その他

ガングリオシドの定量は Synnerholm の方法に従いシアル酸(N-Acetylneuraminic acis：NeuAc)相当量で表した[71]。

Ⅲ. 結果

1. Okra/H_C、111/H_C および単アミノ酸変異型 Okra/H_C の性状

本研究で 14 残基を対象とした 18 種類の単アミノ酸変異型 H_C を調製した(Fig. 7,)。Okra/H_C、111/H_C およびすべての単アミノ酸変異型 Okra/H_C はいずれも同一の方法で精製することが可能で、SDS-PAGE では約 50 kDa の位置に単一のバンドとして泳動された（Fig. 8.）。Okra/H_C と 111/H_C との間に構造的な違いあるいは単アミノ酸変異導入による構造変化が認められるかどうか調べるために、4 つ(Okra、111、H1240A、P1196A)の単アミノ酸変異型 H_C の CD スペクトルの測定を行った。P1196 は Okra 株と 111 株で異なるアミノ酸残基の一つであり、H1240 はガングリオシド結合モチーフの一つである。P1196A は 210 nm から 215 nm 付近が上昇しており、

単アミノ酸変異により構造変化が生じた可能性が示唆された。Okra/H_C、111/H_C、H1240A のモル楕円率には差がなく、構造が維持されていた(Fig. 9)。

^{125}I-Okra/BoNT の シナプトソームに対する結合は未標識の BoNT/B および変異型 H_C で同程度に阻害されたことから、H_C は BoNT/B と同じ受容体認識部位を有していると考えられた (Fig.10)。さらに ^{125}I-Okra/BoNT の再構成リポソームへの結合量を 100 %とし、未標識 Okra/BoNT および Okra/H_C の 50 %結合阻害濃度(IC_{50})を算出したところ、未標識 Okra/BoNT および Okra/H_C の IC_{50} はそれぞれ 0.37 nM、0.32 nM であった。Okra/H_C は Okra/BoNT と同等の結合活性を保持していると考えられた。同様に ^{125}I-Okra/BoNT の再構成リポソームへの結合に対する未標識 111/H_C および Okra/H_C の IC_{50} はそれぞれ、0.79 nM、2.49 nM で(Fig.11)、111/H_C は Okra/H_C よりも低い結合活性を示した。これらの結果は Okra/BoNT および 111/BoNT の受容体結合活性と一致した。

2. W1261 周辺アミノ酸残基の点変異体の受容体への結合活性

BoNT/B とシアルラクトースとの共結晶構造解析により、シアルラクトースが H1240 と W1261 のくぼみに位置することが明らかとなっている[19]。また W1261 と BoNT/A で同位置に相当する W1265 のロイシン変異型(W1261L/B、W1265L/A)BoNT のマウス横隔膜筋標本(MPN)に対する毒性は、劇的に減少することから、BoNT の機能においても重要であることが示されている[56]。

アラニン変異型 H_C H1240A と K1260A は ^{125}I-Okra/H_C の StgII/ガングリオシ

ド GT1b 再構成リポソームへの結合に影響を与えなかったが、ガングリオシド GT1b への結合は阻害された(Table 2, Fig.12A, Fig.13A)。これらの結果から、K1260 は BoNT/B とシアルラクトースとの共結晶構造解析からは予想されていなかった新たなガングリオシド結合部位であることが示唆された。S1259A, W1261A および Y1262A は ^{125}I-Okra/H_C の StgII/ガングリオシド GT1b 再構成リポソームまたはガングリオシド GT1b への結合を阻害した(Table 2, Fig.13A, Fig.14A)。L1263A は ^{125}I-Okra/H_C の StgIIN/ガングリオシド GT1b 再構成リポソームとガングリオシド GT1b の結合いずれにも影響を与えなかった(Table 2, Fig.12A, Fig.13A)。K1260 の性状をさらに詳細に調べるために E および R に置換した K1260E、K1260R を作製した。K1260E は ^{125}I-Okra/H_C の StgIIN/ガングリオシド GT1b 再構成リポソームおよびガングリオシド GT1b への結合を阻害したのに対し、K1260R は Okra/H_C 同様、StgIIN/ガングリオシド GT1b 再構成リポソームおよびガングリオシド GT1b のどちらにも結合活性を保持していた(Table 2)。

3. E1188 付近のアミノ酸残基の点変異体の受容体への結合活性

BoNT/B とシアルラクトースとの共結晶構造解析より、E1188 と E1189 は、それぞれシアル酸とガラクトースに水素結合することから、W1261 近傍のガングリオシド結合部位であることが予想されている。また BoNT/B の立体構造解析により、K1186～K1191 は BoNT/B 分子表面でループを形成している。この領域に Okra/BoNT と 111/BoNT 間で配列が異なることから E1188 付近の 7 つのアミノ酸残基について単

アミノ酸変異型 H_Cを作製した。単アミノ酸変異により構造変化が生じた可能性が示唆された P1196A は、予想どおり、受容体との結合活性を消失していた(Table 2)。6 つのアラニン変異体 K1186A, K1187A, E1188A, E1189A、E1190A および K1191A は再構成リポソームへの結合活性を保持していた(Table 2)。ガングリオシド GT1b との結合活性を消失していたのは K1186A、K1187A、E1189A および K1191A であった。Okra/H_C を 111/H_C の持つアミノ酸残基に置換した K1187E と E1190K は StgIIN/ガングリオシド GT1b 再構成リポソームおよびガングリオシド GT1b との結合活性を消失していた(Table 2, Fig.12B, Fig.13B)。

Fig. 14 に StgII/GT1b 複合体あるいはガングリオシド GT1b との結合に関与するアミノ酸残基をプロットした。BoNT/B のガングリオシド GT1b の認識部位は S1259, W1261, Y1262, K1186, K1187, E1189, K1191, K1260 および H1240 と周辺に広く存在しているが、StgII/GT1b 複合体認識部位は W1261 周辺の限局した位置に存在することが考えられた。

4. BoNT/B のラット小脳顆粒細胞におけるグルタミン酸放出阻害活性に対する単アミノ酸変異型 H_C の効果

小脳顆粒細胞を用いて、高カリウム溶液の脱分極刺激によるグルタミン酸遊離を指標に StgIIN/ガングリオシド GT1b 複合体認識に関与することが予想されたアミノ酸残基の単アミノ酸変異型 H_Cと BoNT/B との競合実験を行った。1 nM BoNT/B 処理でグルタミン酸の遊離は 75 %阻害されたが、500 nM Okra/H_C 存在下でグル

タミン酸遊離阻害の程度は 20 %であった。StgIIN/ガングリオシド GT1b 複合体を認識するアミノ酸残基の点変異体のうち、W1261A、Y1262A はグルタミン酸遊離阻害に影響を与えなかった。111 株 H_C と同じアミノ酸残基に置換した K1187E、E1190K もグルタミン酸遊離阻害に影響を与えなかった。これらの結果はいずれの単アミノ酸変異型 H_C も細胞膜に存在する受容体への結合活性を消失していることを示している。一方、ガングリオシド認識に関与していることが示唆された K1260 のアラニン置換体 K1260A は BoNT/B によるグルタミン酸遊離阻害の程度 60 %であった(Fig. 15)。このことは、BoNT/B のガングリオシド認識部位は毒作用発現に直接的な関与が少ないことを示している。

Ⅳ. 考察

立体構造に基づく受容体結合部位のアミノ酸配列の結果から A～G 型毒素(BoNT/D は除く)と破傷風の H_{CC} にガングリオシド結合モチーフが保存されていることが明らかになり[57, 60]、ガングリオシドのアナログ、シアルラクトースと BoNT/B との共結晶構造解析から H1240 と Y1262 がシアル酸と水素結合し、W1261 は疎水結合し、E1188 はガラクトースと水素結合している [19]。

これまで BoNT/A の蛍光標識したトリプトファン残基がガングリオシド存在下で消光すること[29]、GT1b を含む主要なガングリオシド GM2/GD2 合成酵素欠損マウスは、破傷風毒素、BoNT/A および BoNT/B に耐性を示すことから[32]、ガングリオシドの BoNT の活性発現に果たす役割が注目されてきた。しかし、BoNT/B は StgII と

ガングリオシド GT1b(StgII/GT1b)複合体によく結合することから、BoNT/B のガングリオシド結合に関する部位とStgII/GT1b 複合体認識部位との関係を明らかにする必要がある。本章では、まずガングリオシド結合モチーフを含む W1261 周辺についてアラニン変異型 H_Cを作製し、^{125}I-Okra/H_Cの StgIIN/ガングリオシド GT1b 再構成リポソームおよびガングリオシドGT1b の結合に対する各単アミノ酸変異型H_Cの 50%結合阻害濃度(IC_{50})を調べた。H1240, S1259, W1261 および Y1262 は StgII/GT1b 複合体認識に関与するアミノ酸残基と考えられた。ラット小脳顆粒細胞を用いた単アミノ酸変異型H_CとBoNT/B の競合実験から、StgII/GT1b 複合体認識に関わるアミノ酸残基は、毒性発現に必須であることが考えられた。K1260A は StgII/ST1b 複合体への結合には全く関与せず、ガングリオシド GT1b への結合のみが低下していた。K1260 のもつ塩基性側鎖の役割を調べるために、K1260 を同じ塩基性側鎖をもつアルギニン残基(R)と酸性側鎖をもつグルタミン酸残基(E)に置換し、受容体結合活性を調べた結果から、ガングリオシドとの結合には塩基性側鎖が関与していると考えられた。K1260をガングリオシド結合部位と考え、立体構造上、周辺に存在するアミノ酸残基を検索したところ、近傍にはシアル酸結合部位への関与が予想されている E1188 が存在し、K1186 から K1191 までループを形成する領域を含んでいた。この領域には Okra 株と比較して、毒素活性が低く、受容体との感受性が低い 111 株の異なるアミノ酸残基が存在していた[37, 77]。E1188 周辺のアミノ酸残基の単アミノ酸変異型 H_C (ループ周辺変異体)を用いた受容体結合活性を調べたところ、予想どおり、ガングリオシド GT1b の結合に関与するが、StgII/GT1b の結合に

関与しないアミノ酸残基が多いことがわかった。K1187 と E1190 が 111 株では異なることに注目し、111 株のアミノ酸残基に置換した K1187E と E1190K は StgII/GT1b 複合体へ結合が低下していた。この 2 つのアミノ酸残基の電荷の逆転が 111 株と Okra 株の受容体認識に影響を与え、結果として毒素活性の差に結びついていると考えられた。特に E1190 はアラニン変異型 H_C のガングリオシド GT1b の結合低下が穏やかなのに対し、リジン変異型 H_C の StgII/GT1b 複合体へ結合が大きく低下していることから、StgII 認識部位であることが示唆された。これら結果は、StgIIN 末端領域と BoNT/B の共結晶構造解析により明らかになった BoNT/B 分子の StgII 結合部位[12, 27]を支持するものであった。

Table 1. Mutants of H_C constructed

Mutant name	Primers
K1186A	Fw: TATAAATATTTCGCGAAAGAGGAAG Rv: CTTCCTCTTTCGCGAAATATTTATA
K1187A	Fw: AATATTTTAAAGCAGAGGAAGAAAAATTGT Rv: ACAATTTTTCTTCCTCTGCTTTAAAATATT
K1187E	Fw: AATATTTTAAGGAAGAGGAAGAAAATTGTTCTTAGCTCCTA Rv: TAGGAGCTAAGAACAATTTTTCTTCCTCTTCCTTAAAATATT
E1188A	Fw: CTATAAATATTTTAAAAAAGCGGAAGAAAAATTGT Rv: ACAATTTTTCTTCCGCTTTTTTAAAATATTTATAG
E1189A	Fw: AAAATATTTTAAAAAAGAGGCAGAAAAATTGT Rv: ACAATTTTTCTGCCTCTTTTTTAAAATATTT
E1190A	Fw: AATATTTTAAAAAAGAGGAAGCAAAATTGTTTTTAG Rv: CTAAAAACAATTTTGCTTCCTCTTTTTTAAAATATT
E1190K	Fw: TAAGAAAGAGGAAAAAAAATTGTTCTTAGCTCCTATAAGT Rv: ACTTATAGGAGCTAAGAACAATTTTTTTTCCTCTTTCTTA
K1191A	Fw: TATATTTTAAAAAAGAGGAAGAAGCATTGTTTTTAG Rv: CTAAAAACAATGCTTCTTCCTCTTTTTTAAAATATA
P1196A	Fw:TGTTTTTAGCTGCTATAAGTGACTCTGATGAGT Rv:ACTCATCAGAGTCACTTATATAGCAGCTAAAAACA
G1235A	Fw: AGATAGGATTAATTGCTATTCATCGT Rv: ACGATGAATAGCAATTAATCCTATCT
H1240A	Fw: GGATTGATTGGTATTGCTCGTTTCTACGAATC Rv: GATTCGTAGAAACGAGCAATACCAATCAATCC
S1259A	Fw: GATTATTTTTGTATAGCTAAATGGTACCTAAAAGAGGTAAAAA Rv: TTTTTACCTCTTTTAGGTACCATTTAGCTATACAAAAATAATC
K1260A	Fw: TATTTTTGTATAAGTGCATGGTACCTAAAAGAGGTAAAAA Rv: TTTTTACCTCTTTTAGGTACCATGCACTTATACAAAAATA
K1260E	Fw: TGTATAAGTGAATGGTACCTAAAAGAGGT Rv: ACCTCTTTTAGGTACCATTCACTTATACA
K1260R	Fw: TGTATAAGTAGATGGTACCTAAAAGAGGT Rv: ACCTCTTTTAGGTACCATCTACTTATACA
W1261A	Fw: TATTTTTGTATAAGTAAAGCGTACCTAAAAGAGGTAAAAAGGA Rv: TCCTTTTTACCTCTTTTAGGTACGCTTTACTTATACAAAAATA
Y1262A	Fw: TGTATAAGTAAATGGGCCCTAAAAGAGGTAAAAA Rv: TTTTTACCTCTTTTAGGGCCCATTTACTTATACA
L1263A	Fw: ATAAGTAAATGGTACGCAAAAGAGGTAAAAAG Rv: CTTTTTACCTCTTTTGCGTACCATTTACTTAT

Table 2. Mutation sites and each IC_{50} of mutations

Recombinant H_C	IC_{50}* (nM) StgII/GT1b	GT1b
Okra/Hc	0.5	190
K1186A	1.0	>1000
K1187A	1.1	>1000
K1187E	7.7	>1000
E1188A	0.3	156
E1189A	1.3	>1000
E1190A	0.3	300
E1190K	6.2	885
K1191A	1.9	>1000
P1196A	23.4	852
G1235A	1.9	>1000
H1240A	2.4	>1000
S1259A	34.9	>1000
K1260A	0.7	>1000
K1260E	1.4	>1000
K1260R	0.4	537
W1261A	>100	>1000
Y1262A	>100	>1000
L1263A	0.5	203

*Data are the concentration of 50% binding inhibition and presented as the mean ±S.D. (n=3)

```
Okra 1138 LYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNLNQEWRVYTYKYFKKEEEKLFLAPI 1197
111  1138 LYIGEKFIIRRKSNSQSINDDIVRKEDYIYLDFFNSNREWRVYAYKDFKEEEKKLFLANI 1197
          ********************************** * ***** ** ** ** ***** *

Okra 1198 SDSDEFYNTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVFEEYKDYFC 1257
111  1198 YDSNEFYKTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVLKDYKNYFC 1258
           ** *** ******************************************   ** ***

Okra 1258 ISKWYLKEVKRKPYNLKLGCNWQFIPKDEGWTE                          1291
111  1259 ISKWYLKEVKRKPYNPNLGCNWQFIPKDEGWIE                          1291
          ***************  ************** *
```

Fig. 7. Amino acid sequence alignment of Okra and 111 H_{CC} fragments from GeneBank accession number M81186 for Okra/NT and AB084152 for 111/NT. An asterisk indicates strict sequence conservation. Residues of mutation analysis in this chapter are indicated by a box.

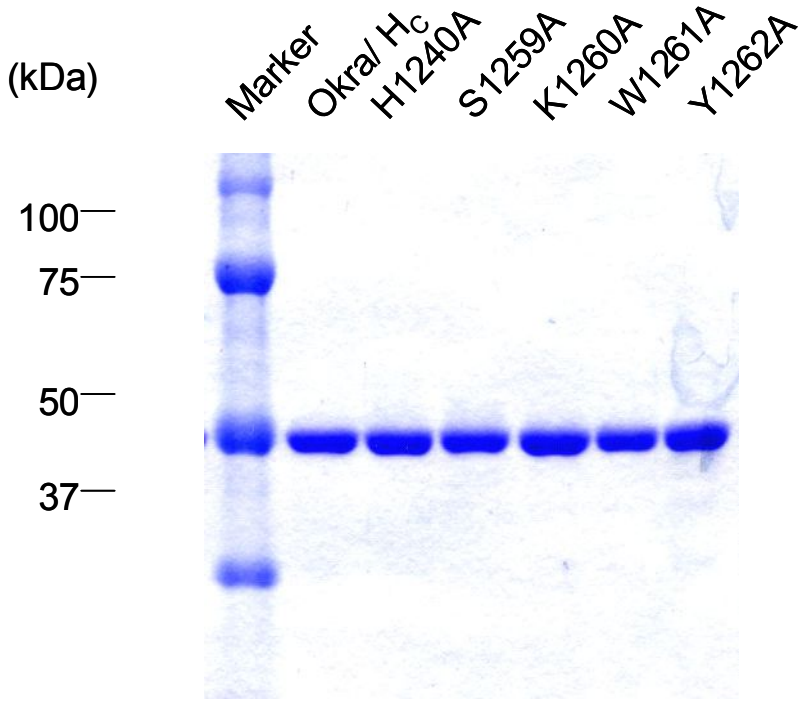

Fig. 8. SDS-PAGE profile of recombinant HC. The sample(1 μg) was applied to a 10% polyacrylamide gel in the presence of 50 mM DTT.

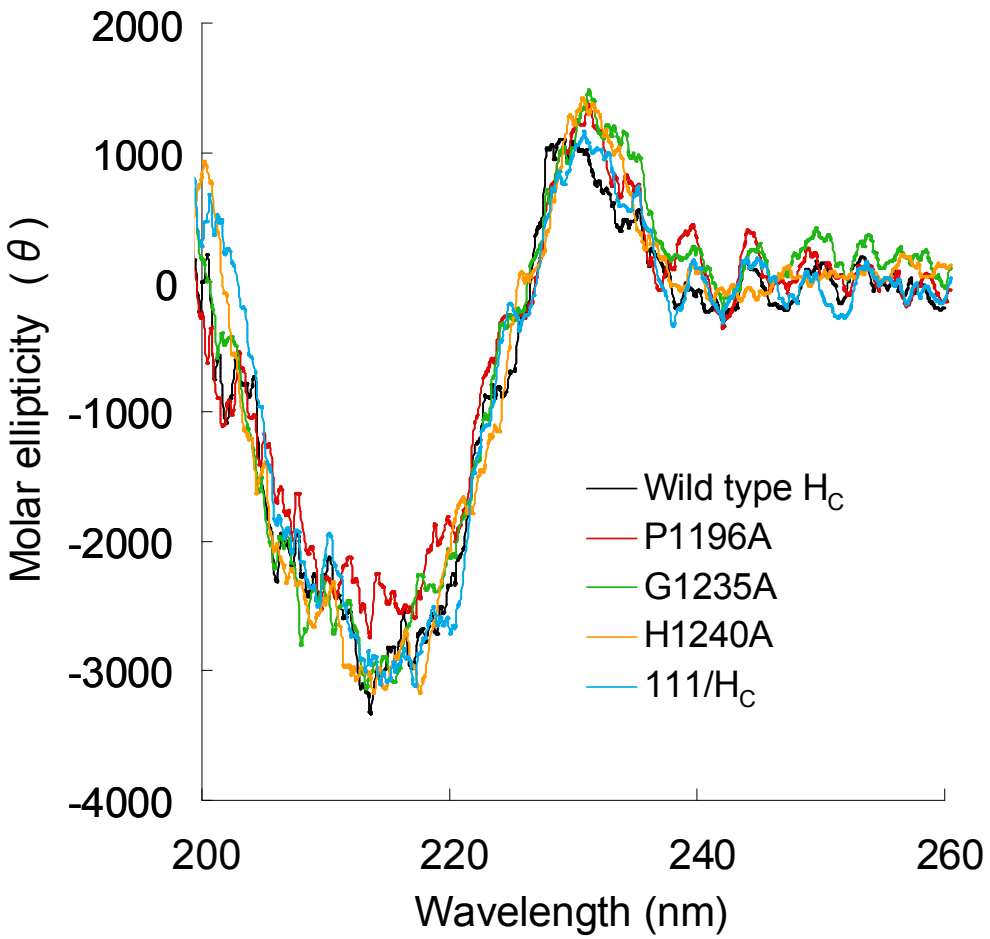

Fig. 9. CD spectroscopy of the recombinant Okra/H_C and its mutants P1196A、G1235A、H1240A and 111/H_C. Far-ultraviolet CD emission spectra were recorded in 50 mM phosphate buffer,pH 6.8 at 25℃.

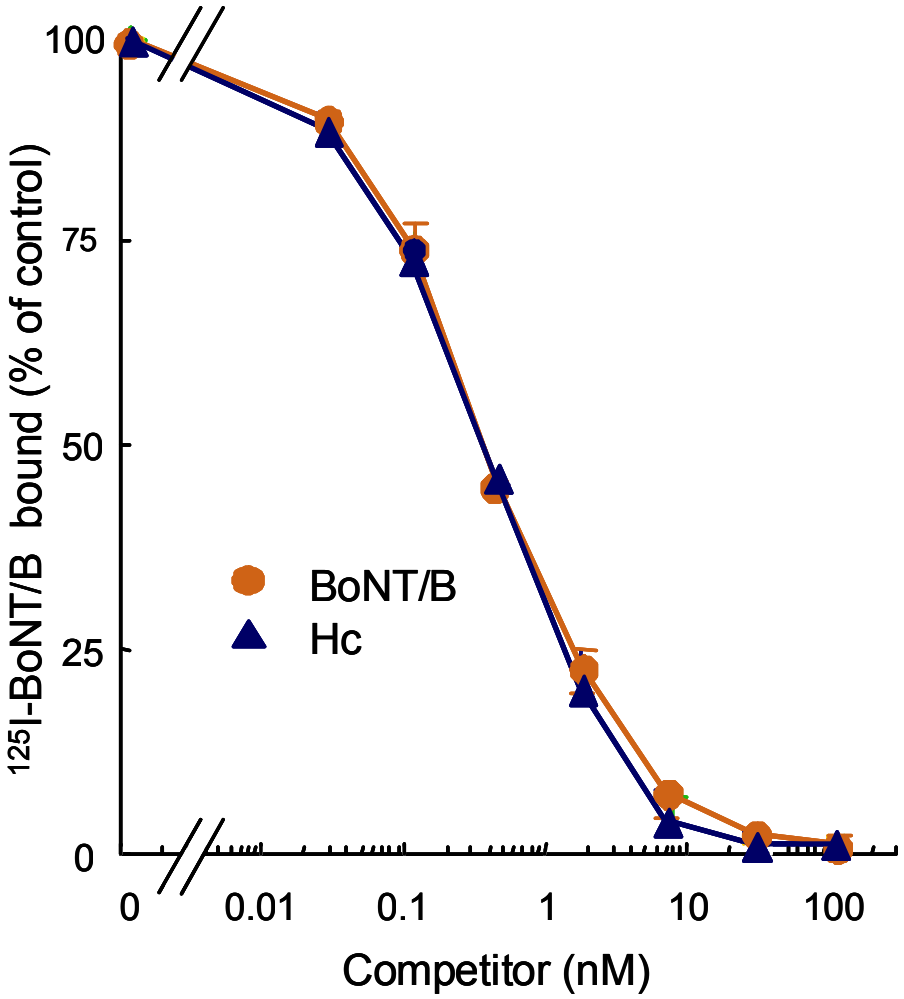

Fig. 10. Competition binding assay of ^{125}I-BoNT/B to synaptosome with BoNT/B and recombinant Okra/H_C

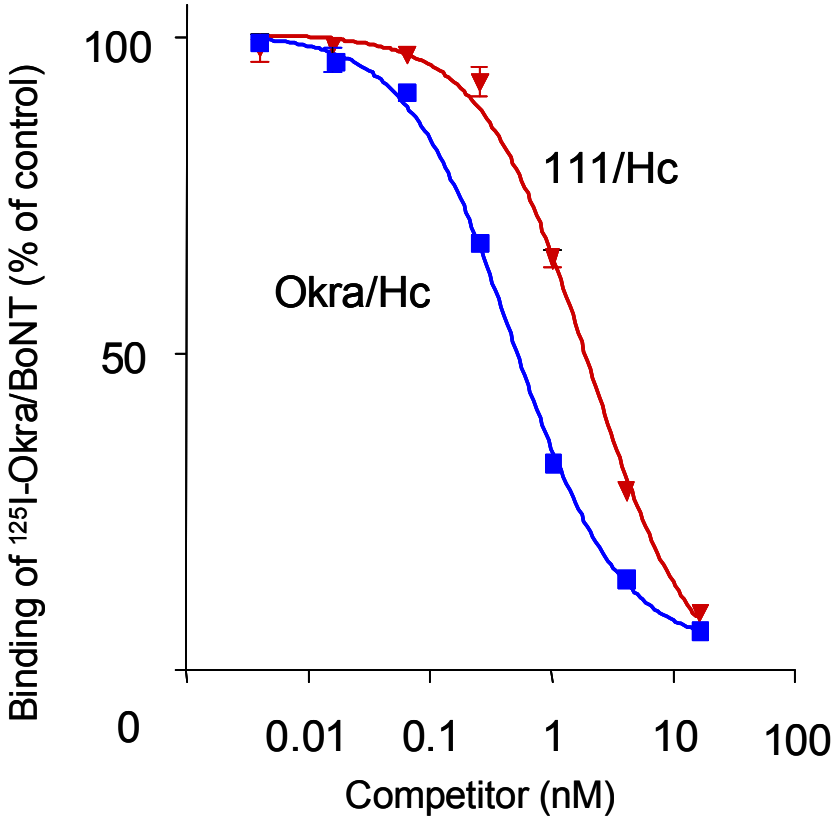

Fig. 11. Competition binding assay of ^{125}I-Okra/BoNT to stgII/ganglioside GT1b complex with recombinant Okra/H_C and 111/H_C

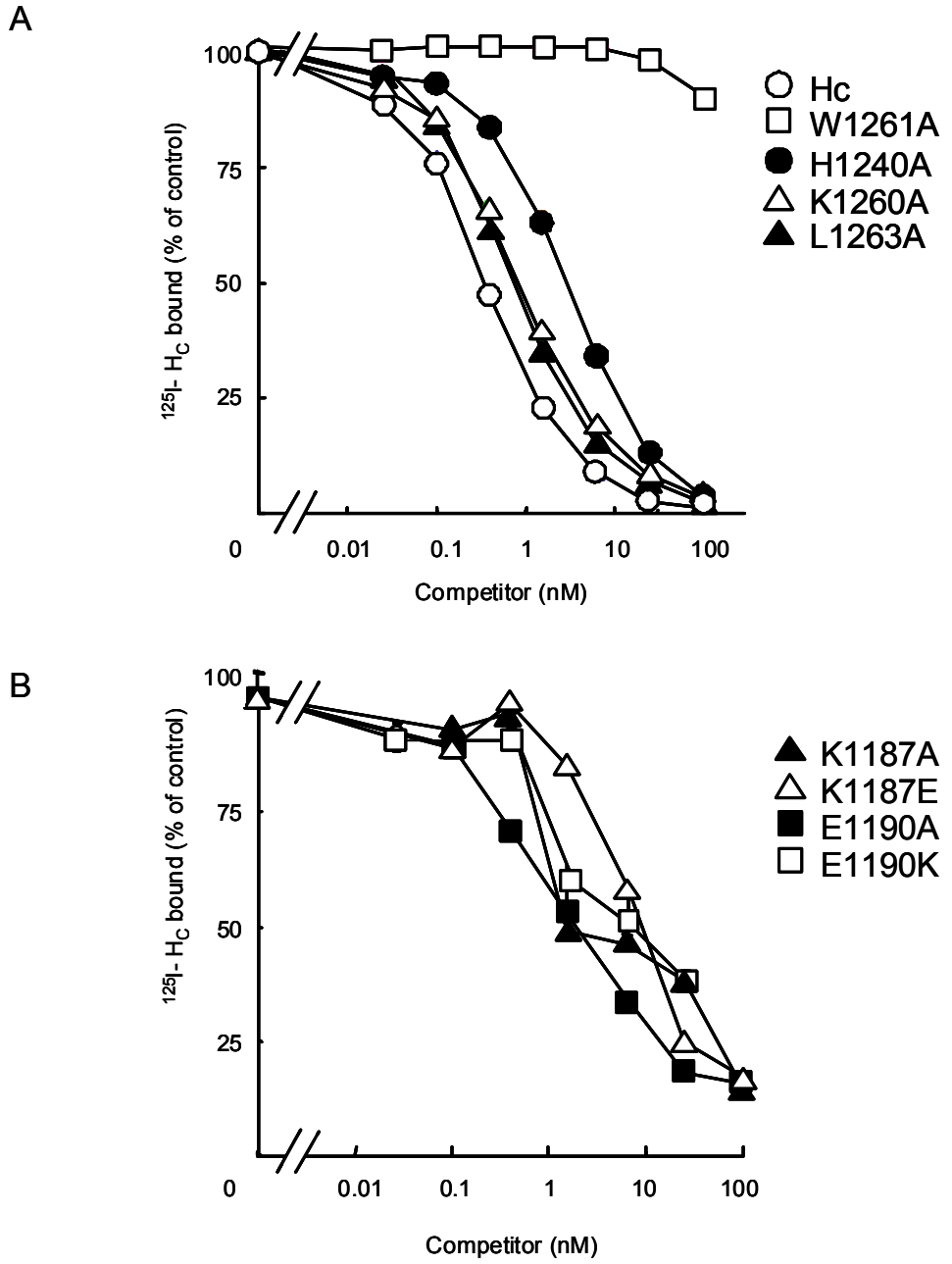

Fig. 12. Competition binding assays of ^{125}I-HC to StgII/GT1b with unlalabeled representative H_C mutants. ^{125}I-H_C (0.5 nM) was added to the recombinant StgII (5 ng/ml) reconstituted into lipid vesicles with ganglioside GT1b (2.5 ng NeuAc) in presence of increasing concentration of unlabeled H_C mutants. Each point represents the mean of three determinations. The bar shows standard error.

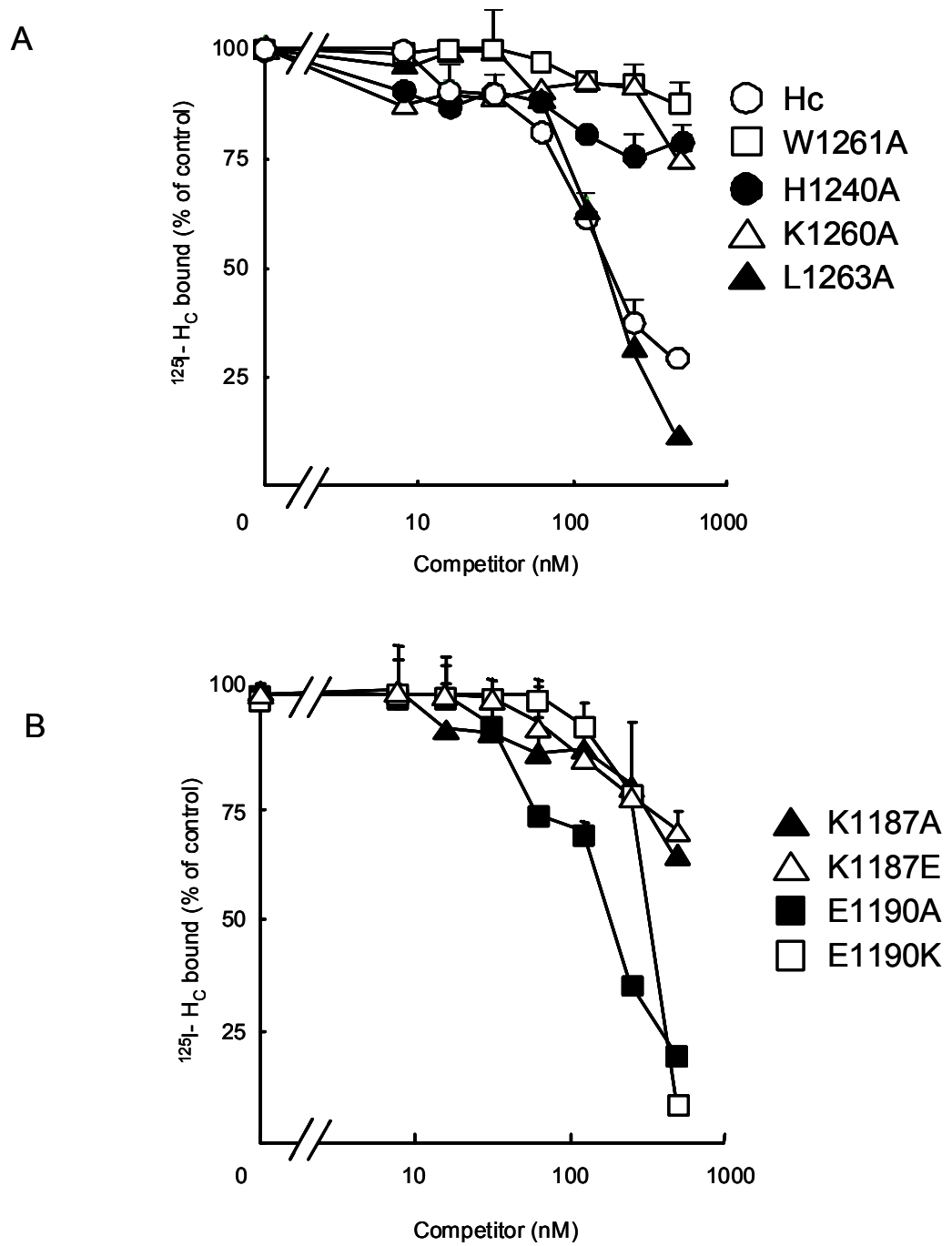

Fig. 13. Competition binding assays of ^{125}I-HC to ganglioside GT1b with unlalabeled representative H_C mutants. ^{125}I-H_C (0.5 nM) was added to gangliosode GT1b immobilized on microtiter plate (50 ng/NeuAc/well) in presence of increasing concentration of unlabeled H_C mutants. Each point represents the mean of three detteminations. The bar shows standard error.

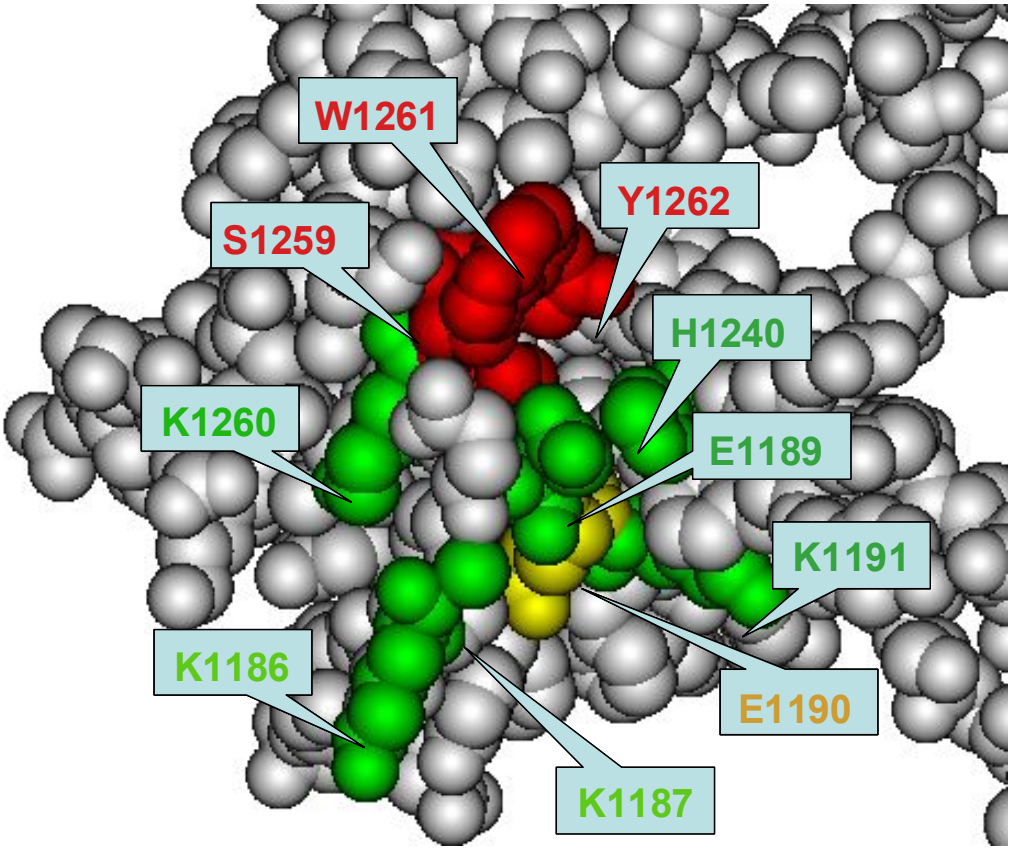

Figure 14. Three-dimensional structure of b-trefoil subdomain of H_{CC}. Red residues are StgII/GT1b and ganglioside GT1b binding site, green residues are ganglioside GT1b binding sites and yellow residues may be determination of the different binding affinities between Okra/NT and 111/NT.

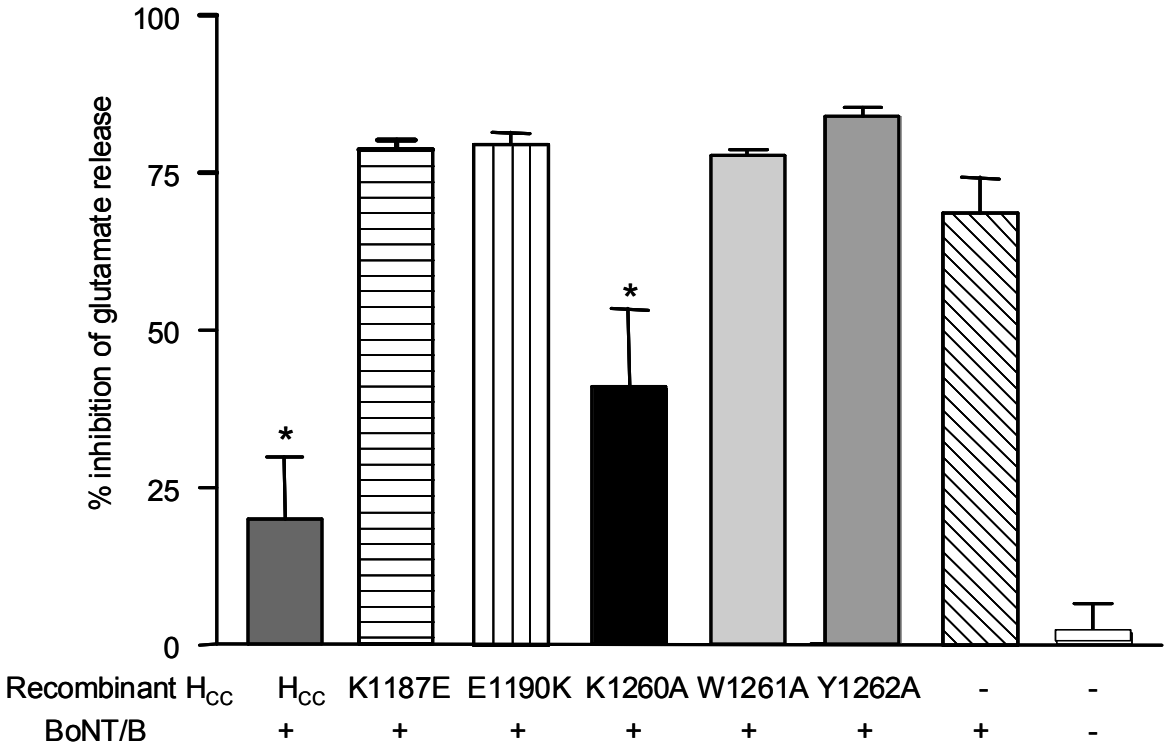

Fig. 15. Effects of BoNT/B with competitor on the depolarized-evoked glutamate release from rat cerebellar cells. Inhibition of potassium-stimulate glutamate release from rat cerebellar granule cells was determinated in the presence of BoNT/B and competing H_C mutants. One nanomolar BoNT/B was added to rat cerebellar granule cells with 500 nM H_C mutants. Each point represents the mean of three determinations. The bar shows standard error.(* = $P<0.05$ as compared to BoNT/B treated cells)

第 3 章　シナプトタグミン II 発現 PC12 細胞を用いたボツリヌス B 型神経毒素の作用機構の解析

Ⅰ．緒言

これまで BoNT/B の受容体認識機構を解明する中で、BoNT/B 分子にはガングリオシドを認識する部位と StgII/ガングリオシド GT1b 複合体認識に関する部位が多少異なることを明らかにしてきた。しかしながら、Stg の機能的な受容体としての働きについての実験的な確証は十分には得られていない[51]。元来 StgI と StgIX、微量の StIV が発現している PC12 細胞に StgII 遺伝子を導入すると、BoNT/B 処理により VAMP2 の分解が観察されているが[14]、2 つの Stg が同時に毒作用に関与するため、これらが機能的受容体としてどの程度関与しているのかを区別して理解することはできない。StgI ノックアウトラット由来初代海馬培養細胞を用いて、StgI または StgII 遺伝子を挿入し、脱分極刺激によるシナプス小胞の開口放出と BoNT/B、BoNT/G および BoNT/A の取り込みを蛍光免疫染色で比較した報告はある[16]が、定量的には解析が不十分と思われる。本章では、これまでの実験成績を基にして、StgII を導入した StgI 欠損 PC12 細胞[63]と野生型 PC12 細胞の BoNT/B に対する感受性をガングリオシド GT1b の有無で調べることにより、StgI と StgII それぞれの BoNT/B の機能的受容体としての役割を調べた。また、リコンビナント点変異 StgIIN 蛋白を用いた BoNT/B の結合活性や共結晶構造解析により予想された StgIIN の BoNT/B 認識部位について、単アミノ酸変異 StgII を導入し StgI 欠損 PC12 細胞を

BoNT/B 処理することにより、StgII の受容体蛋白として機能するために必要なアミノ酸残基の特定を試みた。

Ⅱ．材料および方法

1. 単アミノ酸変異型 StgIIN および部分欠損変異 StgIIN の作製と精製

単アミノ酸変異型 StgIIN の作製には、pMAL-c2 に挿入されている膜貫通ドメインを含むＮ末端領域(1～87 残基) (pMAL-c2/Stg2N) をコードしている遺伝子から *Sac*I と *Bam*HI を用いて Stg2N を切り出し、pBluescript II (SK-) vector (Toyobo) にライゲーションした。これを鋳型とし、標的とする単アミノ酸変異を含むプライマーを用いて(Table 3) Pfu ポリメラーゼ(STRATAGENE)により PCR を行い、単アミノ酸変異を含んだ DNA を増幅した。PCR 産物を *Dpn*I エンドヌクレアーゼ処理し、大腸菌を形質転換後、プラスミドを抽出しシークエンスを確認した。単アミノ酸変異 StgIIN 遺伝子は単アミノ酸変異 StgIIN を含む pBluescript II (SK-) vector から *Sac*I と *Bam*HI で切断し、同制限酵素で切断した pMAL-c2 vector にライゲーションを行い、大腸菌を形質転換した。部分欠失変異 StgIIN は点変異 StgIIN 作製時に使用した StgIIN 遺伝子を含む pBluescript II (SK-) vector を鋳型として N 末端 1 から 30 残基（Δ1-30)あるいは 40 残基(Δ1-40)を欠失するように設計したプライマー(Table 3) を使用し、部分欠失 StgIIN を PCR により増幅した。PCR 産物は *Sac*I、*Bam*HI 処理後、pBluescript II (SK-) vector にライゲーションし、シークエンスを確認した。部分欠失 StgIIN は発現用ベクターpMAL-c2 ベクターに挿入後、

大腸菌 DH5 αを形質転換した。点変異型 StgIIN および部分欠失変異型 StgIIN の精製は MBP-StgIIN と同様の方法で行った。点変異 StgIIN および MBP-欠損変異型 StgIIN(Δ1-30, Δ1-40)の性状は MBP-StgIIN と同様にガングリオシド共存下でリポソームに組み込み、反応に使用した。

2. StgII 遺伝子発現クローンの作製

ラット脳 cDNA ライブラリーから StgII 遺伝子全長(442 残基)を PCR により増幅し、pENTR/D-TOPO(Invitrogen)にクローニングした(StgII/pENTR/D-TOPO)。ガングリオシド共存下で StgIIN リポソームに組み込んだ ^{125}I-BoNT/B との結合活性を 100 %としたとき、単アミノ酸変異型 StgIIN の結合活性が 50%以下に低下したアミノ酸残基をアラニンに置換した単アミノ酸変異型 StgII を作製した。点変異体 StgIIN 遺伝子をもつディスティネーションベクターの構築には、StgIIN/pMAL-c2 を制限酵素 *Not*I、*Nde*I で切り出し、pCR4-TOPO (Invitrogen)に挿入した。シークエンスを確認した後、単アミノ酸変異を含む StgII を pCR4-TOPO から制限酵素 *Not*I、*Nde*I で切断し、同じ制限酵素で切断した StgII/pENTR/D-TOPO とライゲーションを行い単アミノ酸変異 StgII/pENTR/D-TOPO を作製した。StgII/pENTR/D-TOPO または単アミノ酸変異 StgII/pENTR/D-TOPO から StgII 遺伝子を LR 反応により Gateway ディスティネーションベクター pcDNA 3.2/V5-DEST(Invitrogen)に挿入し(発現クローン:StgII/pcDNA3.2/V5-DEST)、大腸菌 JM109 を形質転換した。発現クローンを含む大腸菌をアンピシリン 100

μg/ml を含む LB 培地で 37℃6 時間振とう培養後、菌体を遠心により回収し、GeneElute Endotoxin-free Plasmid midiprep kit (Sigma Aldrich)を用いてそれぞれの DNA を精製した。

3. StgII または単アミノ酸変異型 StgII 発現 PC12 細胞の作製

蛍光免疫染色には各ウエルにカバーガラスを入れた 24 穴プラスティックプレート(0.5 ml/well)、Western blotting には 12 穴プラスティックプレート(1 ml/well)を用い、ポリエチレンイミンでコートした。StgI 欠損 PC12 細胞(北里大学 高橋正身教授より分与)(2 x 10^5/ml)を抗生剤を除く維持培地(RPMI-1640-5% horse serum-5 % fetal bovine serum)で一晩培養した。Opti-MEM I (Invitrogen)で希釈した DNA(1.6 μg/100 μl)と Lipofectamine 2000(4 μl/100 μl:Invitrogen) [42]を混合し、室温で 20 分間静置後、200 μl の DNA と Lipofectamine の複合体を StgI 欠損 PC12 細胞に添加した。4 時間静置後、維持培地(RPMI-1640, 50 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin-5% horse serum-5 % fetal bovine serum)に交換し、18～24 時間後に実験に供した。

4. StgII 発現 PC12 細胞の蛍光免疫染色

StgII 発現 PC12 細胞の培地を取り除き、PBS(-)で 2 回洗浄した(0.5 ml/well)後、4 %パラホルムアルデヒド-PBS(0.4 ml/well)で 25 分間固定後 PBS(-)を用いて 3 回洗浄した(0.5 ml/well)。PC12 細胞を透過性にして観察する場合は、0.2 % Triton

X-100-PBS で室温 5 分間処理後、PBS(-)を用いて 3 回洗浄した(0.5 ml/well)。ブロックエース(大日本薬品工業)で 2 時間または一晩ブロッキングを行った(0.3 ml/well)。細胞を 1 回 PBS で洗浄した後、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO)で希釈した 1 次抗体を細胞に加え(0.2 ml/well)4℃で一晩、室温で 2 時間反応させた。TBST(25 mM Tris-HCl, pH 7.5-137 mM NaCl-0.05 %v/v Tween20)で 5 分間 4 回洗浄後(0.7 ml/well)、2 次抗体 Alexa488 標識 Goat Anti-Mouse IgG(Invitorojen)または Cy3 標識 Goat Anti-1Mouse IgG(Bio-Rad)を TBST で希釈し、室温で 1 時間処理後、TBST で 5 分間 4 回洗浄後、カバーガラスを取り出し、スライドガラス上に PermaFlur Aqueous Mounting Medium(Thermo)でマウントした。細胞の観察は BIOREVO (KEYENCE)を用いて行った。

5. 野生型 PC12 細胞および StgII 発現 PC12 細胞の BoNT/B に対する反応性

野生型 PC12 細胞および StgII 発現 PC12 細胞の維持培地を取り除き、PBS(-)で 2 回洗浄後、高カリウム溶液 (50 mM KCl, 80 mM NaCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 10 mM glucose, pH 7.4)に交換した(800 μl/well)。高カリウム溶液で最終濃度の 100 倍に希釈した BoNT/B を 1/100 量(8 μl/well)添加し、37℃15 分間静置した。ガングリオシド GT1b の添加は BoNT/B 処理と同時に行った。高カリウム溶液を取り除き、維持培地に交換し、さらに 18 時間培養後、PBS(-)に交換しセルスクレイパー(グライナー)を用いて回収した。点変異体 StgII 発現 PC12 細胞も同様の方法で BoNT/B 処理を行った。それぞれの細胞は可溶化溶液(PBS-0.5%

Triton X-100, 0.05% SDS, Protease inhibitor)で懸濁し、氷上で 1 時間静置後、遠心(13,000 x *g*, 10 分間)により、上清を回収した。4 倍濃縮 SDS-Sample buffer を添加し、SDS-PAGE を行い PVDF 膜に Western blotting 後、VAMP2 の切断の程度は化学発光基質を用いて検出した。

6. 使用抗体

ウサギ pAb にはラット StgII の N 末端 20 残基のペプチド抗体($StgII_N$)、VAMP2 の N 末端 20 残基のペプチド抗体を用い、細胞内標準蛋白としてマウス mAbβ-アクチン(Sigma)を、マウス mAb StgI(1D12：北里大学 高橋 正身教授から分与)を用いた。

7. その他

SDS 電気泳動は 15 %濃度ゲルを用い Laemmli の方法に従った。細胞の可溶化上清の蛋白量は BCA 法(Thermo)[65]に従って測定し、牛γグロブリン相当量として示した。Western blotting の発色には SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo)を用いて行い、ルミノイメージアナライザー LAS-3000(GE healthcare)で撮影した。

Ⅲ. 結果

1. StgI および StgII の野生型 PC12 細胞および StgI 欠損変異型 PC12 細胞で

の発現

PC12 細胞と StgII 発現 PC12 細胞における StgI あるいは StgII の発現をラット脳シナプトソーム(P2) 分画を陽性コントロールとし各 Stg 抗体(pAb $StgII_N$ および mAb 1D12)Western blotting で調べた。野生型 PC12 細胞には StgI が発現し、StgI 欠損 PC12 細胞は StgI、StgII いずれも発現はなかった。StgII 発現 PC12 細胞の StgII 発現量は、野生型 PC12 細胞における StgI よりも少なかった(Fig. 16)。各 Stg に対する特異抗体を用いて PC12 細胞、StgI 欠損 PC12 細胞および StgII 発現 PC12 細胞について Stg の発現を免疫蛍光染色法で確認した。TritonX-100 未処理 StgII 発現 PC12 細胞では、$StgII_N$ 抗体を用い免疫蛍光染色したところ、細胞膜に強い StgII の発現がみられたことから、StgII の N 末端領域が細胞膜上に存在することを確認した(Fig. 17)。

2. BoNT/B の StgII 発現 PC12 細胞に対する感受性

StgII 発現 PC12 細胞の BoNT/B に対する感受性の変化を野生型 PC12 細胞と比較して調べた。毒素処理したそれぞれの細胞を可溶化し、Western blotting を行い、$StgII_N$(65 kDa)または $StgI_N$(65 kDa)、β-アクチン(42 kDa)および VAMP2(18 kDa)抗体を用い検出した。高濃度の BoNT/B でのみ、野生型 PC12 細胞の VAMP2 に切断がみられた。BoNT/B 処理と同時に 15 NeuAc μg/ml ガングリオシド GT1b 処理すると、VAMP2 切断は促進された。StgII 発現 PC12 細胞は、BoNT/B 濃度に依存して VAMP2 の切断が認められたが、ガングリオシド GT1b の添加により

低濃度の BoNT/B でも VAMP2 の切断は観察された(Fig. 18)。

3. 単アミノ酸変異型 StgII 発現 PC12 細胞に対する BoNT/B の作用

ガングリオシド GT1b 共存下で単アミノ酸変異型 StgIIN を組み込んだリポソームに対する ^{125}I-BoNT/B の結合活性では 5 つのアミノ酸残基のアラニン変異型(F47A、F54A、F55A、E57A および K60A)に毒素結合能の低下が認められたが、△1-30 および△1-40StgIIN 欠損変異型の毒素の結合活性は野生型とほぼ同等であった(Fig. 19)。これらのことは、StgIIN の BoNT/B 結合部位は比較的狭い領域(40～60 残基)に存在することを示している。この結果は、BoNT/B と StgIIN(40-59 残基)の共結晶構造解析から予想された結果と一致していた[12, 27]。これら 5 つのアミノ酸残基のうち、F55 以外は StgI と共通して存在していた(Fig. 20)。アラニン変異型(F47A、F54A、F55A、E57A および K60A)StgII を StgI 欠損 PC12 細胞に導入し、単アミノ酸変異型 StgIIPC12 細胞を作製した。各細胞における単アミノ酸変異型 StgII の発現は Western botting と蛍光免疫染色で確認した。4 種の単アミノ酸変異 StgII 発現 PC12 細胞(F47A、F54A、F55A、および K60A)では BoNT/B の結合が確認できず、同時に VAMP2 の切断も認められなかった(Fig. 21A, 21B)。単アミノ酸変異型 E57A 発現 PC12 細胞に BoNT/B が結合し、この細胞の VAMP2 が切断された(Fig. 21A, 21B)。これらの結果から、StgII に特異なアミノ酸残基 F55 は StgII の BoNT/B 認識を決定するために必須であることを示している。

Ⅳ．考察

一般にStgIIは末梢神経系に、StgIは中枢神経系に発現していることが知られている。BoNT/Bの結合部位であるN末端領域の2つのStgの相同性は46 %であり、カルシウム結合部位が存在するC末端領域の88 %に比べて低い[22]。StgIおよびStgIIはBoNT/Bの受容体構成成分であり、C末端領域はBoNT/B結合には関与せず、膜貫通領域はガングリオシドの疎水部分であるセラミドとの結合に必須と考えられている[38]。BoNT/Bに対しStgIは低親和性蛋白であり、StgIIは高親和性蛋白であると報告されている[50]。StgIIのN末端領域から膜貫通領域(60残基)内でガングリオシドと相補的に働き、受容体としてBoNT/Bとの結合に直接関与する部位を点変異体および欠失変異体を用いてアミノ酸レベルまで調べた。StgII の N 末端から30残基、40残基まで欠損させた変異型は wild type と同様の BoNT/B への結合活性を有したことから、StgII 分子内 41～60 番目の領域内に受容体として機能するために必要なアミノ酸残基が集約されていることが明らかになった。さらにこの 20 残基のアミノ酸残基を対象として、単アミノ酸変異型 StgIIN を作製し、その結合活性を調べた結果、BoNT/B 結合に関与するアミノ酸残基は 5 つの残基(F47, F54, F55, E57, K60)であった。これらの結果を基にして、StgIIの機能的な受容体としての働きを調べるために、StgI欠損PC12細胞にStgII遺伝子を導入した。野生型PC12細胞は高濃度条件以外では VAMP2 が認められないが、ガングリオシド添加によりVAMP2が認められた。高濃度のBoNT/BによるVAMP2の切断は、PC12内在性のガングリオシドによるものであると考えられた[83]。一方、StgII は単独でも受容体と

して機能的に働き、VAMP2 を毒素濃度依存性に分解した。さらにガングリオシド GT1b を添加することにより、VAMP2 の切断は促進された。この結果は StgII/ガングリオシド GT1b 複合体を形成することが、受容体としての機能を発揮するために必要であることを示している。

BoNT/B と結合することが予想された StgII 分子内の F47、F54、F55、E57、K60 をアラニン変異した変異型 StgII 発現 PC12 細胞を BoNT/B 処理し、BoNT/B の単アミノ酸変異型 StgII に対する結合と VAMP2 の切断の程度を調べた。E57A を除く、F47A、F54A、F55A および K60AStgII 発現 PC12 細胞には BoNT/B が結合せず、VAMP2 の分解も観察されなかった。F47、F54、K60 は StgI および StgII で良く保存されているが、F55 は StgI ではメチオニン残基に相当 StgII とは異なるアミノ酸残基であった。StgII と StgI の BoNT/B に対する結合活性の差に関して、GST 融合 StgII 点変異体と BoNT/B のプルダウンアッセイの結果から、StgII の I58, N59 を StgI の同位置に相当するアミノ酸残基に置換した I58L, N59H は、StgI の性状をもつと報告されている[12]。本研究では、I58A および N59A 変異体は BoNT/B 結合活性を低下させなかったが、それぞれのアミノ酸残基を StgI と同一にすることで結合能に変化を及ぼす可能性が考えられた。一方、本研究では StgII 特異なアミノ酸残基 F55 は BoNT/B 結合に重要な働きを担っていると考えられた。

Table 3. Mutants of StgII constructed

Mutant name	Primers
R2A	Fw: ATCGAGGGTCGTATGGCAAACATCTTTAAAAGGAACCAGGAGCCC Rv: GGGCTCCTGGTTCCTTTTAAAGATGTTTGCCATACGACCCTCGAT
N3V	Fw: GCTCGATCGAGGGTCGCATGCGAGTCATCTTCAAGAGGAACC Rv: GGTTCCTCTTGAAGATGACTCGCATGCGACCCTCGATCGAGC
K6A	Fw: ATGAGAAACATCTTCGCGAGGAACCAGGAGCCC Rv: GGGCTCCTGGTTCCTCGCGAAGATGTTTCTCAT
R7A	Fw: CGTATGAGAAACATCTTTAAAGCGAACCAGGAGCCCATTGTG Rv: CACAATGGGCTCCTGGTTCGCTTTAAAGATGTTTCTCATACG
N8V	Fw: CGTATGAGAAACATCTTTAAAAGGGTCCAGGAGCCCATTGTGG Rv: CCACAATGGGCTCCTGGACCCTTTTAAAGATGTTTCTCATACG
E10A	Fw: CAAGAGGAACCAGGCGCCAATTGTGGCTCCGG Rv: CCGGAGCCACAATTGGCGCCTGGTTCCTCTTG
T17I	Fw: GCCCATTGTGGCGCCGGCCATCACCACTGCCAC Rv: GTGGCAGTGGTGATGGCCGGCGCCACAATGGGC
T18I	Fw: GCCCATTGTGGCGCCGGCCACCATCACTGCCACAATG Rv: CATTGTGGCAGTGATGGTGGCCGGCGCCACAATGGGC
T21I	Fw: ACCACCACTGCCATAATGCCTCTGGCACCC Rv: GGGTGCCAGAGGCATTATGGCAGTGGTGGT
N32V	Fw: CGCCGCACCTGCCGACGTCTCTACAGAGAGCACG Rv: CGTGCTCTCTGTAGAGACGTCGGCAGGTGCGGCG
T34I	Fw: GCCGATAACTCTATAGAGTCGACGGGCACCGGGG Rv: CCCCGGTGCCCGTCGACTCTATAGAGTTATCGGC
S33R	Fw: CCCGCCGCACCCGCGGATAACGCTACAGAGAGCAC Rv: GTGCTCTCTGTAGCGTTATCCGCGGGTGCGGCGGG
E35A	Fw: CCGATAACTCTACAGCTAGCACGGGCACCGG Rv: CCGGTGCCCGTGCTAGCTGTAGAGTTATCGG
S36A	Fw: AATTCTACAGAGGCCACGGGTACCGGGGAGAGC Rv: GCTCTCCCCGGTACCCGTGGCCTCTGTAGAGTT
E41A	Fw: CACGGGCACCGGCGCCAGCCAAGAAGACATG Rv: CATGTCTTCTTGGCTGGCGCCGGTGCCCGTG
S42A	Fw: GCACGGGCACCGGTGAGGCCCAAGAAGACATG Rv: CATGTCTTCTTGGGCCTCACCGGTGCCCGTGC
Q43A	Fw: CGGGCACCGGGGAGTCTGCAGAAGACATGTTCG Rv: CGAACATGTCTTCTGCAGACTCCCCGGTGCCCG
E44A	Fw: CCGGGGAGAGCCAAGCAGACATGTTCGCC Rv: GGCGAACATGTCTGCTTGGCTCTCCCCGG

Table 3. Mutants of StgII constructed (continued)

Mutant name	Primers
D45A	Fw: GAGCCAAGAAGCCATGTTCGCGAAGCTGAAGGAC Rv: GTCCTTCAGCTTCGCGAACATGGCTTCTTGGCTC
M46A	Fw: GAGAGCCAAGAAGATGCATTCGCCAAGCTGAAGG Rv: CCTTCAGCTTGGCGAATGCATCTTCTTGGCTCTC
F47A	Fw: CCAAGAAGACATGGCCGCCAAGCTTAAGGACAAATTC Rv: GAATTTGTCCTTAAGCTTGGCGGCCATGTCTTCTTGG
K49A	Fw: GAAGACATGTTCGCCGCTTTAAAGGACAAATTCTTC Rv: GAAGAATTTGTCCTTTAAAGCGGCGAACATGTCTTC
K51A	Fw: CATGTTCGCCAAGCTAGCGGACAAATTCTTCAATG Rv: CATTGAAGAATTTGTCCGCTAGCTTGGCGAACATG
D52A	Fw: CATGTTCGCCAAGCTTAAGGCCAAATTCTTCAATGAGATC Rv: GATCTCATTGAAGAATTTGGCCTTAAGCTTGGCGAACATG
K53A	Fw: GCCAAGCTGAAGGACGCGTTCTTCAATGAGATC Rv: GATCTCATTGAAGAACGCGTCCTTCAGCTTGGC
F54A	Fw: CCAAGCTGAAGGACAAGGCCTTCAATGAGATCAAC Rv: GTTGATCTCATTGAAGGCCTTGTCCTTCAGCTTGG
F55A	Fw: GCTGAAGGACAAATTCGCGAATGAGATCAACAAGATCCC Rv: GGGATCTTGTTGATCTCATTCGCGAATTTGTTCTTCAGC
N56V	Fw: GAAGGACAAATTCTTCGTTGAGATTAATAAGATCCCTTTGCCCCC Rv: GGGGGCAAAGGGATCTTATTAATCTCAACGAAGAATTTGTCCTTC
E57A	Fw: CAAATTCTTCAATGCGATTAATAAGATCCCTTTGCCCCCC Rv: GGGGGGCAAAGGGATCTTATTAATCGCATTGAAGAATTTG
I58A	Fw: ATTCTTCAATGAGGCCAACAAGATCCCTTTGCCC Rv: GGGCAAAGGGATCTTGTTGGCCTCATTGAAGAAT
N59A	Fw: CTTCAATGAGATCGCGAAGATCCCTTTGCCCCCC Rv: GGGGGGCAAAGGGATCTTCGCGATCTCATTGAAG
N59V	Fw: GGACAAATTCTTCAATGAGATCGTCAAGATCCCTTTGCCCCCC Rv: GGGGGGCAAAGGGATCTTGACGATCTCATTGAAGAATTTGTCC
K60A	Fw: ATTCTTCAATGAGATTAATGCGATCCCTTTGCCCCC Rv: GGGGGCAAAGGGATCGCATTAATCTCATTGAAGAAT
Δ1-30	Fw: AATTCGAGCTCGATCGAGGGTCGTGATAACTCTACAGAGAGCACGGGC Rv: CTAGAGGATCCTATTAACAGATGCAGAAGC
Δ1-40	Fw: AATTCGAGCTCGATCGAGGGTCGTGAGAGCCAAGAAGACATGTTCGCC Rv: CTAGAGGATCCTATTAACAGATGCAGAAGC

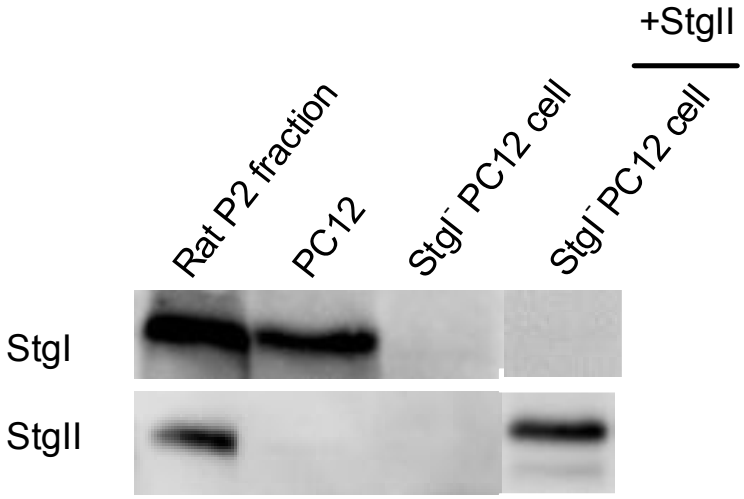

Fig. 16. StgII expressed in PC12 and StgI$^-$ cells. Cells were harvested in PBS plus 0.5 % triton X-100, 0.05 % SDS, and were incubated for 30 min on ice. Sample were centrifuged and subjected to SDS-PAGE and western blotting analysis. Blots were developed using ECL.

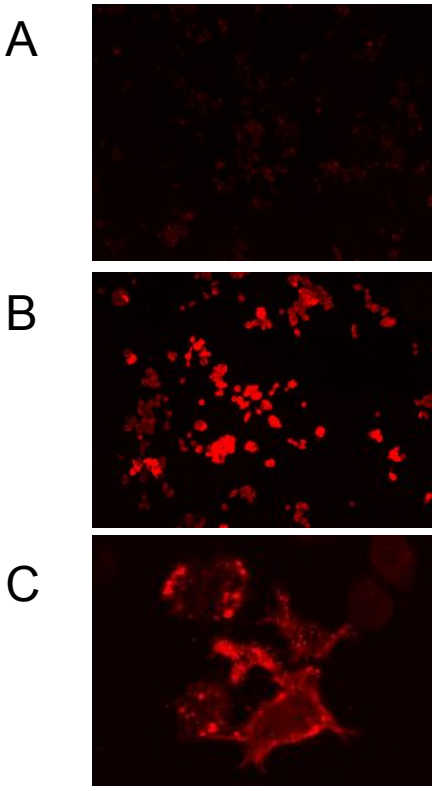

Fig. 17. StgII transfected in StgI$^-$ PC12 cells. Full-length rat StgII gene was used to transfect StgI$^-$ PC12 cells (B, C). Permeabilized (A, B) or intact (C) cells were immunostained with pAb StgII$_N$ and Cy3-conjugated goat anti rabbit IgG.

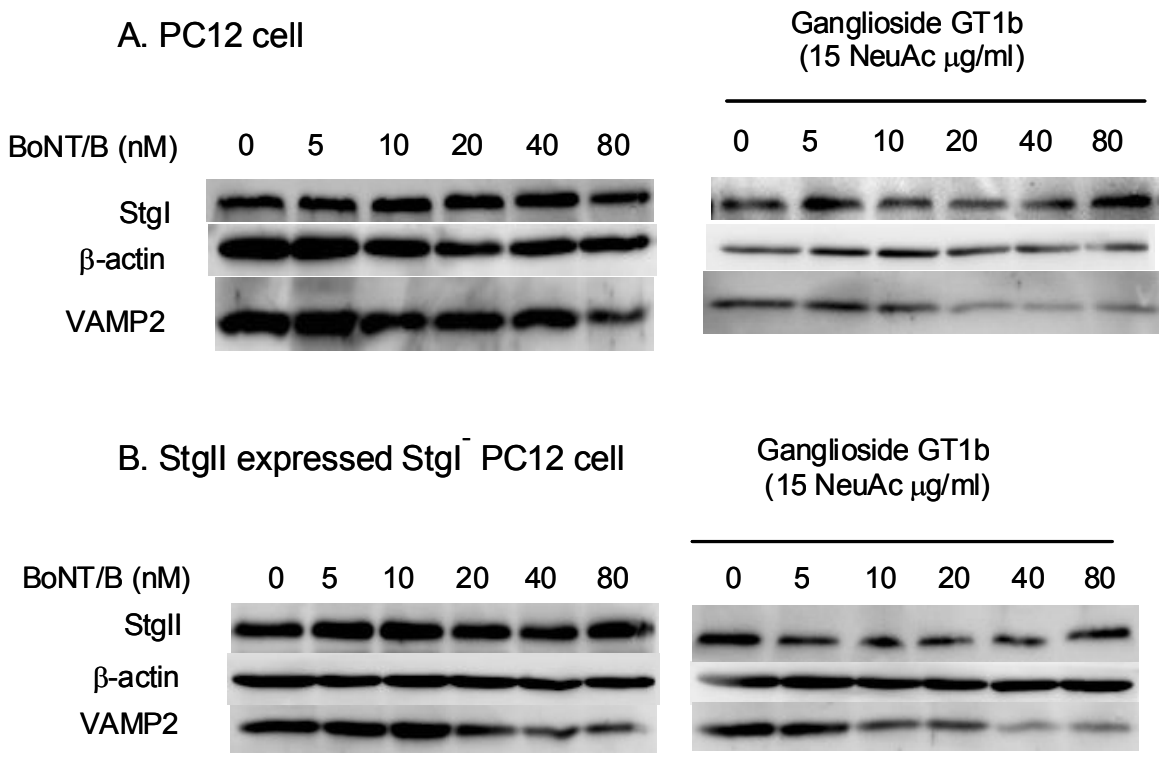

Fig. 18. Intoxicated PC12 and StgII expressed PC12 cells. Cells were harvested and incubated with lysis buffer (PBS plus0.5 % Triton X-100, 0.05 % SDS, and protease inhibitor cocktail), for 1 h on ice. Samples were centrifuged at 2,000 x *g* for 10 min, and the proteins in the supernatant were subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis were developed using ECL.

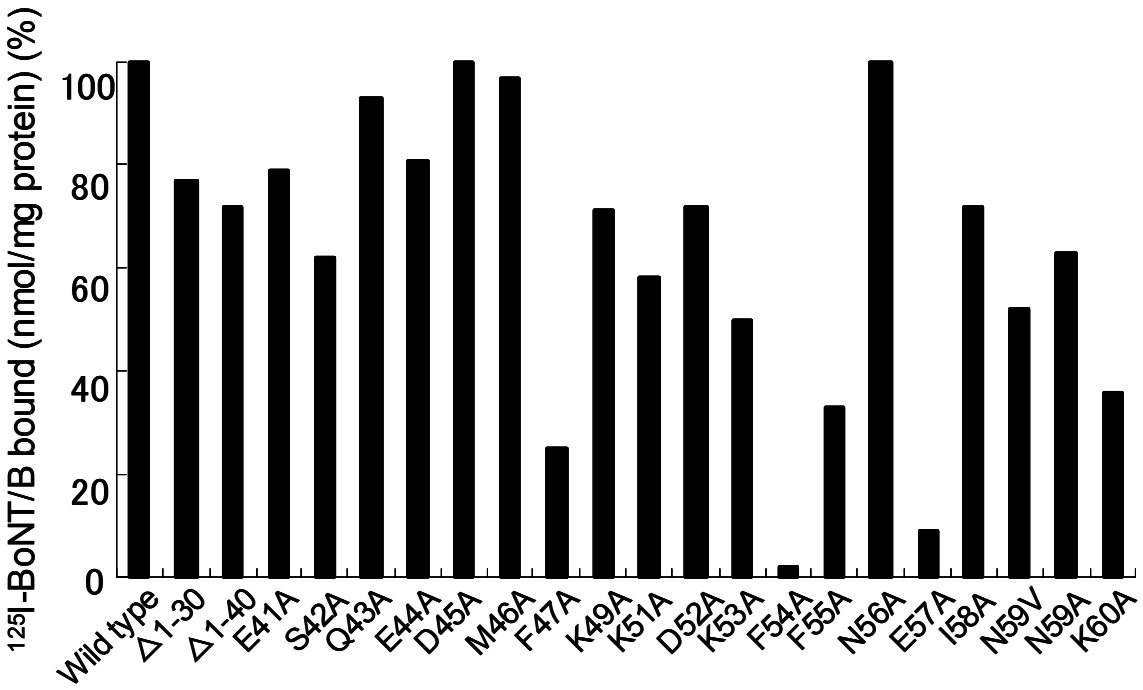

Fig. 19. Binding of ^{125}I-BoNT/B to MBP-StgIIN (-87aa) deletion and site-directed mutants in the presence of ganglioside GT1b. The reconstituted lipid vesicles containing MPB-StgIIN(wild type) or deletion or point mutants (5 ng) and GT1b (1.25 NeuAc ng) were used for ^{125}I-BoNT/B binding at a final concentration of 0.25 nM.

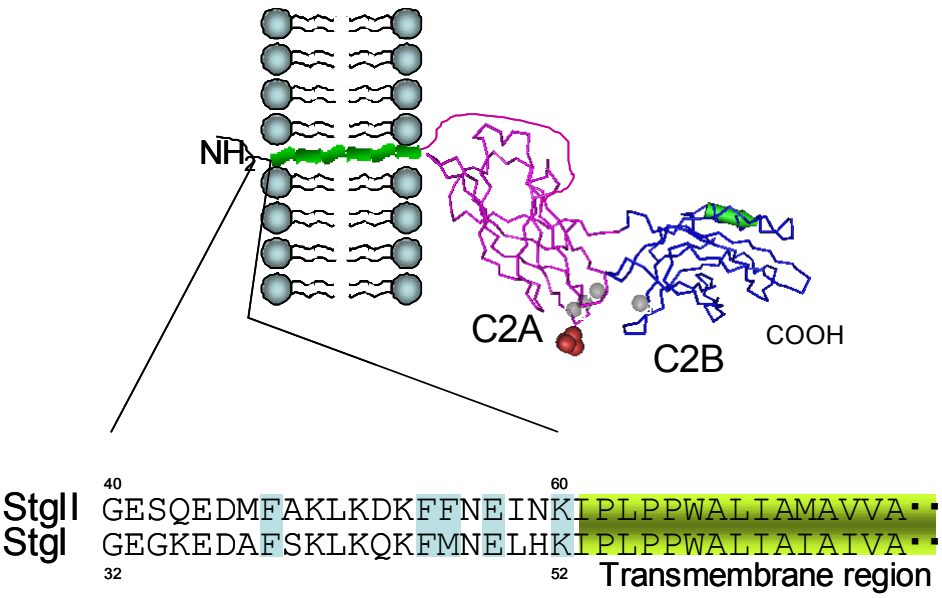

Fig. 20. The crystal structure of the cytosolic region of StgIII (PDB entry 1DQV) was added with remaining region. The blue box indicate the five residues that are mutated in StgII.

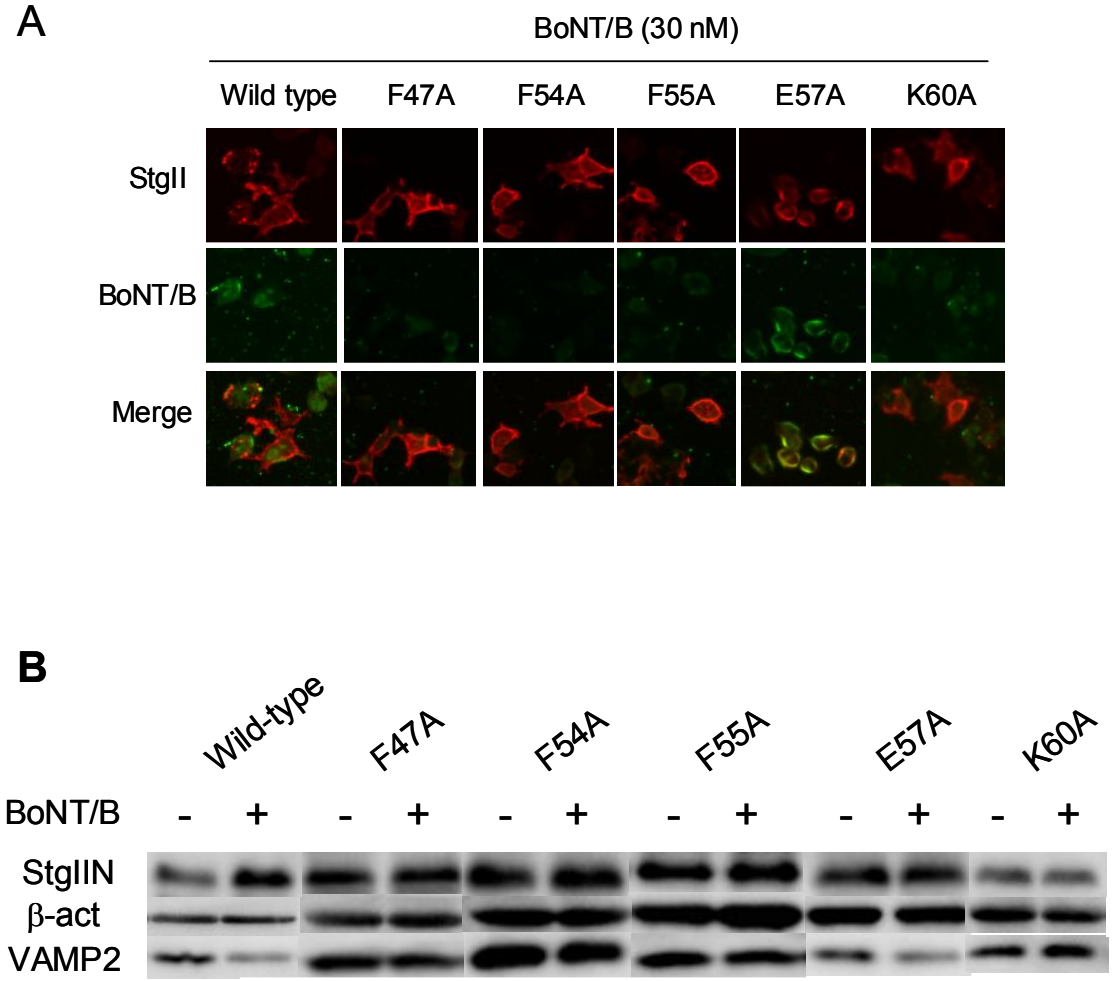

Fig. 21. A) Wild-type and mutants in the binding site of StgII^{+} cells. Binding and entry of BoNT/B were visualized using anti-BoNT/B and StgII$_{N}$.
B) Effect of BoNT/B on VAMP2 degradation in StgII mutant expressed PC12 cells. PC12 cells treated with 30 nM BoNT/B in exostense of 15 μg NeuAc/ml of ganglioside GT1b.

総合考察

BoNT は自然界で最も強力な細菌毒素であり、バイオテロに使われる可能性の高い毒物に分類される。BoNT は過剰に緊張している神経終末を緩和する作用をもつことから、硬直性麻痺等の種々の疾病の治療薬としての適用が増加している。さらに運動神経系への使用だけでなく、中枢神経系への使用も試みられている[1, 2, 78]。BoNT がどのようなメカニズムで毒性発現するのかを明らかにするために、神経細胞への侵入機構、細胞内での動態等様々な研究が展開されている。その中で、BoNT の神経特異性を理解するために、BoNT 受容体の検索と受容体に結合した BoNT の経路を明らかにすることに焦点が当てられてきた。初めて BoNT/B の特異受容体がシナプス小胞開口放出時の Ca^{2+}センサーである StgI および II とガングリオシド GD1a および GT1b の複合体であることが報告された[49]。StgI および II はシナプス小胞膜蛋白質であり、基質蛋白も同じシナプス小胞膜蛋白 VAMP2 であることから、BoNT/B がシナプス小胞のリサイクリングを利用し、神経細胞に侵入し毒作用を発揮することが明らかになった。本研究ではシナプトソームを用いて神経伝達物質遊離阻害とシナプス小胞の基質蛋白の分解が同時に起こることを示し、細胞質内で毒作用の本態である軽鎖が単独で存在していることを実証した。型特異受容体と BoNT との結合様式をアミノ酸レベルで明らかにするために、BoNT/B の受容体認識領域である H_Cの単アミノ酸変異型を用いて受容体との結合試験を試み、これと共結晶構造解析の報告を比較しながら、BoNT/B の受容体部位の特定を試みた。ガ

ングリオシドGT1b認識に関与するアミノ酸残基は、結晶構造解析から予想された領域より広範囲に存在し、ガングリオシド GT1b/StgII 複合体認識部位（S1259、W1261、Y1262）は W1261 を中心とした限局した領域であった。これらの単アミノ酸変異型 H_C は、BoNT/B による小脳顆粒細胞からの神経伝達物質阻害を抑制しなかったことから、これらのアミノ酸残基は受容体認識に機能的な役割を担っていると考えられた。

BoNT/B 標準株である Okra 株と乳児ボツリヌス症由来 111 株の H_C 間でアミノ酸残基の変異が存在する。その中で、Okra 株 H_C の K1187 と E1190 が重要であり、これらを 111 株 H_C と同様の K1187E あるいは E1190K に置換した Okra 株 H_C の結合活性は低下し、その程度は GT1b 単独への結合よりガングリオシド GT1b/StgII 複合体の結合能への影響が大きかった。これらの結果は、K1187、E1190 は StgII 認識に必須なアミノ酸であることを示唆している。

StgII(40～60 残基)と BoNT/B の共結晶構造解析から、StgII は 45～59 残基間でα-ヘリックス構造を形成することで BoNT/B と結合すると報告されている[27]。この構造の変化により、StgII の BoNT/B 認識ドメインと BoNT/B を疎水結合することが示唆された。このようなα-ヘリックス構造への変化は BoNT/A の L 鎖とその基質である SNAP-25 の結合でも起こることが共結晶構造解析より明らかになっている[8]。

α-ヘリックス構造内に存在する I58, N59 は StgII に特異なアミノ酸残基であり、この 2 つのアミノ酸残基を、StgI で相同な位置に存在するアミノ酸残基に置換した変異型 I58L/N59H StgII は StgI と同等の結合様式を持つことが報告されている[12]。

また StgII の I58 は Okra 株 BoNT の E1190 と直接結合することが報告されているが、このアミノ酸残基は 111 株 BoNT ではリジンに置換しており、この違いが結合活性の低下を反映していると考えられる。本研究で新たに F55 が BoNT/B との結合で重要であることがわかった。このアミノ酸残基は共結晶構造解析では BoNT/B の Y1182 と F55 結合することが報告された。

BoNT/B の受容体への結合活性を評価するために、StgII およびガングリオシドをリポソームに組み込んだ *in vitro* 法が簡易法として用いられている。しかし、この方法で得られる結果は、膜上に存在している受容体と BoNT との結合様式を十分に反映していないことも事実である。本研究では PC12 細胞に受容体蛋白 Stg を発現し、BoNT/B に対する機能的な受容体としての働きを明らかにすることを目的とした。StgII 遺伝子を導入した StgI 欠損 PC12 細胞は BoNT/B に対して感受性であったことから、StgII は単独で受容体となり得ることが明らかになった。この成績は、BoNT が、まず神経膜に存在するポリシアルガングリオシドに結合し、その後、型特異的な受容体蛋白に結合するという Two step binding モデルとは異なる。さらに野生型 PC12 細胞はガングリオシド添加で BoNT/B に感受性を示し、StgII 発現 PC12 細胞に対してガングリオシドは BoNT/B の毒性を増加させた。これらの事実は、BoNT が神経細胞に作用する際に、ガングリオシドは Stg に代表されるような蛋白受容体と相補的に働き、同時に必要であることを示している。

従って、BoNT と受容体との相互関係は受容体蛋白とガングリオシドの分布状況に左右されると予測された。B 型以外他の毒素受容体の性状も次第に明らかになる

つつあるが、BoNT 分子の持つ受容体結合様式を詳細に調べることが、毒作用の全貌を明らかにするために必要な今後の課題であると思われる。

今後、分子レベルで明らかになってきた BoNT と受容体との相互作用を利用し、神経科学分野や臨床医療現場での BoNT の作用機序に基づいた利用の幅が広がることが期待される。

結論

1. BoNT はシナプトソーム膜上の受容体に結合し、シナプス細胞膜で一部の BoNT が還元され、シナプス小胞に侵入後、L 鎖だけが細胞質に遊離し、毒素活性を発揮することが示唆された。
2. BoNT/B 分子のガングリオシド GT1b の認識部位は W1261 周辺に広く存在しているが、StgII/GT1b 複合体認識部位は W1261 限局した位置に存在し、毒性発現に必須な結合部位であると考えられた。
3. StgI はガングリオシド GT1b 共存下で StgII は単独で BoNT/B の受容体として機能することが明らかになった。また BoNT/B の受容体として StgII 分子上で必須なアミノ酸残基は F47, F54, F55, K60 であることを明らかにした。特に StgII 特異なアミノ酸残基 F55 は BoNT/B 結合に重要な働きを担っていると考えられた。

謝辞

StgI 欠損 PC12 細胞および抗体を分与してくださり、多大なご教示を賜りました北里大学　医学部　高橋正身　教授に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、終始多大なご指導とご教示を賜りました大阪府立大学大学院生命環境科学研究科　小崎俊司教授に深く感謝の意を表します。

学位論文を作成するにあたり、多大なご指導とご教示を賜りました大阪府立大学大学院生命環境科学研究科　山崎　伸二教授、三宅　眞実教授に深く感謝の意を表します。

多大なご指導とご教示賜りました大阪府立大学大学院　生命環境科学研究科　向本雅郁　准教授、大阪府立大学大学院　理学研究科　居原秀　准教授に深く感謝の意を表します。

本研究の実施にあたり、ご協力を賜りました大阪府立大学　森本文宏氏、木村紀代氏、中矢貴広氏、瀬戸幸路氏に深く感謝をいたします。

参考文献

1. **Antonucci F, Di Garbo A, Novelli E, Manno I, Sartucci F, Bozzi Y, and Caleo M.** 2008. Botulinum neurotoxin E (BoNT/E) reduces CA1 neuron loss and granule cell dispersion, with no effects on chronic seizures, in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Exp Neurol 210(2):388-401.

2. **Antonucci F, Bozzi Y, and Caleo M.** 2009. Intrahippocampal infusion of botulinum neurotoxin E (BoNT/E) reduces spontaneous recurrent seizures in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia 50(4):963-966.

3. **Ashton AC, and Dolly JO.** 1988. Characterization of the inhibitory action of botulinum neurotoxin type A on the release of several transmitters from rat cerebrocortical synaptosomes. J Neurochem 50(6):1808-1816.

4. **Baldwin MR, and Barbieri JT.** 2009. Association of botulinum neurotoxins with synaptic vesicle protein complexes. Toxicon 54(5):570-574.

5. **Baldwin MR, Kim JJ, and Barbieri JT.** 2007. Botulinum neurotoxin B-host receptor recognition: it takes two receptors to tango. Nat Struct Mol Biol 14(1):9-10.

6. **Bittner MA, DasGupta BR, and Holz RW.** 1989. Isolated light chains of botulinum neurotoxins inhibit exocytosis. Studies in digitonin-permeabilized chromaffin cells. J Biol Chem 264(18):10354-10360.

7. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

8. **Breidenbach MA, and Brunger AT.** 2004. Substrate recognition strategy

for botulinum neurotoxin serotype A. Nature 432(7019):925-929.

9. **Brose, N., A. G. Petrenko, T. C. Sudhof and Jahn, R.** 1992. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. Science 256(5059): 1021-1025.

10. **Burnette, W. N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 112(2): 195-203.

11. **Casale R, and Tugnoli V.** 2008. Botulinum toxin for pain. Drugs R D 9(1):11-27.

12. **Chai Q, Arndt JW, Dong M, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER, and Stevens RC.** 2006. Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. Nature 444(7122):1096-1100.

13. **Costantin L, Bozzi Y, Richichi C, Viegi A, Antonucci F, Funicello M, Gobbi M, Mennini T, Rossetto O, Montecucco C et al.** 2005. Antiepileptic effects of botulinum neurotoxin E. J Neurosci 25(8):1943-1951.

14. **Dong M, Richards DA, Goodnough MC, Tepp WH, Johnson EA, and Chapman ER.** 2003. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. J Cell Biol 162(7):1293-1303.

15. **Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, and Chapman ER.** 2006. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. Science 312(5773):592-596.

16. **Dong M, Tepp WH, Liu H, Johnson EA, and Chapman ER.** 2007. Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons. J Cell Biol 179(7):1511-1522.

17. **Dong M, Liu H, Tepp WH, Johnson EA, Janz R, and Chapman ER.** 2008. Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum

neurotoxin E into neurons. Mol Biol Cell 19(12):5226-5237.

18. **Dunn LA, and Holz RW.** 1983. Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. J Biol Chem 258(8):4989-4993.

19. **Eswaramoorthy S, Kumaran D, and Swaminathan S.** 2001. Crystallographic evidence for doxorubicin binding to the receptor-binding site in Clostridium botulinum neurotoxin B. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57(Pt 11):1743-1746.

20. **Foran P, Lawrence G, and Dolly JO.** 1995. Blockade by botulinum neurotoxin B of catecholamine release from adrenochromaffin cells correlates with its cleavage of synaptobrevin and a homologue present on the granules. Biochemistry 34(16):5494-5503.

21. **Fu Z, Chen C, Barbieri JT, Kim JJ, and Baldwin MR.** 2009. Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. Biochemistry 48(24):5631-5641.

22. **Geppert M, Archer BT, 3rd, and Sudhof TC.** 1991. Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. J Biol Chem 266(21):13548-13552.

23. **Geppert, M., Y. Goda, Hammer RE, Li C, Rosahi TW, Stevens CF and Sudhof TC.** 1994. Synaptotagmin I: a major Ca2+ sensor for transmitter release at a central synapse. Cell 79(4): 717-727.

24. **Ginalski K, Venclovas C, Lesyng B, and Fidelis K.** 2000. Structure-based sequence alignment for the beta-trefoil subdomain of the clostridial neurotoxin family provides residue level information about the putative ganglioside binding site. FEBS Lett 482(1-2):119-124.

25. **Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Sudhof TC, and Niemann H.** 1994. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. EMBO J 13(21):5051-5061.

26. **Jankovic J.** 2004. Botulinum toxin in clinical practice. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75(7):951-957.

27. **Jin R, Rummel A, Binz T, and Brunger AT.** 2006. Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. Nature 444(7122):1092-1095.

28. **Kamata Y, and Kozaki S.** 1994. The light chain of botulinum neurotoxin forms channels in a lipid membrane. Biochem Biophys Res Commun 205(1):751-757.

29. **Kamata Y, Yoshimoto M, and Kozaki S.** 1997. Interaction between botulinum neurotoxin type A and ganglioside: ganglioside inactivates the neurotoxin and quenches its tryptophan fluorescence. Toxicon 35(8):1337-1340.

30. **Keller JE, Cai F, and Neale EA.** 2004. Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons. Biochemistry 43(2):526-532.

31. **Kitamura M, and Sakaguchi G**. (1969) Dissociation and reconstitution of 12-S toxin of Clostridium botulinum type E. (Translated from eng) *Biochim Biophys Acta* 194(2):564-571 (in eng).

32. **Kitamura M, Takamiya K, Aizawa S, and Furukawa K.** 1999. Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. Biochim Biophys Acta 1441(1):1-3.

33. **Koriazova LK, and Montal M.** 2003. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. Nat Struct Biol 10(1):13-18.

34. **Kozaki S, Sakaguchi S, and Sakaguchi G.** 1974. Purification and some properties of progenitor toxins of Clostridium botulinum type B. Infect Immun 10(4):750-756.

35. **Kozaki S, Miyazaki S, and Sakaguchi G.** 1977. Development of antitoxin with each of two complementary fragments of Clostridium botulinum type B derivative toxin. Infect Immun 18(3):761-766.

36. **Kozaki S, Oga Y, Kamata Y, and Sakaguchi G.** 1985. Activation of Clostridium botulinum type B and E derivative toxins with lysine-specific protease. FEMS Microbiol Lett 27 :149-154.

37. **Kozaki S, Kamata Y, Nishiki T, Kakinuma H, Maruyama H, Takahashi H, Karasawa T, Yamakawa K, and Nakamura S.** 1998a. Characterization of Clostridium botulinum type B neurotoxin associated with infant botulism in japan. Infect Immun 66(10):4811-4816.

38. **Kozaki S, Kamata Y, Watarai S, Nishiki T, and Mochida S.** 1998b. Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for Clostridium botulinum neurotoxins. Microb Pathog 25(2):91-99.

39. **Lacy DB, and Stevens RC.** 1999. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. J Mol Biol 291(5):1091-1104.

40. **Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, and Stevens RC.** 1998. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. Nat Struct Biol 5(10):898-902.

41. **Laemmli, UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-685.

42. **Lee JH, Ahn HH, Kim KS, Lee JY, Kim MS, Lee B, Khang G, and Lee HB.** 2008. Polyethyleneimine-mediated gene delivery into rat pheochromocytoma PC-12 cells. J Tissue Eng Regen Med 2(5):288-295.

43. **Littleton, JT. and HJ. Bellen**. 1995. Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a Ca(2+)-dependent manner. Trends Neurosci 18(4): 177-183.

44. **Lowry, OH., NJ. Rosebrough, Farr AL, and Randall RJ.** 1951. Protein

measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193(1): 265-275.

45. **Lucioni A, Reynolds WS, Rapp DE, Katz M, and Bales GT.** 2008. The use of botulinum toxin for treatment of lower urinary tract symptoms. Minerva Urol Nefrol 60(2):93-103.

46. **McCurdy LH. and BS. Graham** 2003. Role of plasma membrane lipid microdomains in respiratory syncytial virus filament formation. J Virol 77(3): 1747-1756.

47. **Mitchell B. and Gerwing J.** 1969 Dissociation studies on the toxin of Clostridium botulinum type B. (Translated from eng) *Biochim Biophys Acta* 181(1):336-338 (in eng).

48. **Montecucco C, Schiavo G, and Pantano S.** 2005. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? Trends Biochem Sci 30(7):367-372.

49. **Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M, and Kozaki S.** 1994. Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. J Biol Chem 269(14):10498-10503.

50. **Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sato K, Sekiguchi M, Takahashi M, and Kozaki S.** 1996a. The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. FEBS Lett 378(3):253-257.

51. **Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sekiguchi M, Takahashi M, and Kozaki S.** 1996b. Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. Neurosci Lett 208(2):105-108

52. **Perin, MS, N Brose, Jahn R. and Sudhof TC.** 1991. Domain structure of synaptotagmin (p65). J Biol Chem 266(1): 623-629.

53. **Pfeifer G, Schirmer J, Leemhuis J, Busch C, Meyer DK, Aktories K, and Barth H.** 2003. Cellular uptake of Clostridium difficile toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. J Biol Chem 278(45):44535-44541.

54. **Rummel A, Bade S, Alves J, Bigalke H, and Binz T.** 2003. Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. J Mol Biol 326(3):835-847.

55. **Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, and Binz T.** 2004. Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. J Biol Chem 279(29):30865-30870.

56. **Rummel A, Eichner T, Weil T, Karnath T, Gutcaits A, Mahrhold S, Sandhoff K, Proia RL, Acharya KR, Bigalke H et al.** 2007. Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. Proc Natl Acad Sci U S A 104(1):359-364.

57. **Rummel A, Hafner K, Mahrhold S, Darashchonak N, Holt M, Jahn R, Beermann S, Karnath T, Bigalke H, and Binz T.** 2009. Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. J Neurochem 110(6):1942-1954.

58. **Sakaguchi G.** 1982. Clostridium botulinum toxins. Pharmacol Ther 19(2):165-194.

59. **Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, and Montecucco C**. 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature 359(6398):832-835.

60. **Schmitt J, Karalewitz A, Benefield DA, Mushrush DJ, Pruitt RN,**

Spiller BW, Barbieri JT, and Lacy DB. 2010. Structural analysis of botulinum neurotoxin type G receptor binding. Biochemistry 49(25):5200-5205.

61. **Schneider WJ, Goldstein JL, and Brown MS.** 1980. Partial purification and characterization of the low density lipoprotein receptor from bovine adrenal cortex. J Biol Chem 255(23):11442-11447.

62. **Sheridan RE.** 1998. Gating and permeability of ion channels produced by botulinum toxin types A and E in PC12 cell membranes. Toxicon 36(5):703-717.

63. **Shoji-Kasai Y, Yoshida A, Sato K, Hoshino T, Ogura A, Kondo S, Fujimoto Y, Kuwahara R, Kato R, and Takahashi M.** 1992. Neurotransmitter release from synaptotagmin-deficient clonal variants of PC12 cells. Science 256(5065):1821-1823.

64. **Simpson, LL.** 1986. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. Annu Rev Pharmacol Toxicol 26: 427-453.

65. **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150(1):76-85.

66. **Stenmark P, Dong M, Dupuy J, Chapman ER, and Stevens RC.** 2010. Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding. J Mol Biol 397(5):1287-1297.

67. **Sugawara Y, Matsumura T, Takegahara Y, Jin Y, Tsukasaki Y, Takeichi M, and Fujinaga Y.** 2010. Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. J Cell Biol 189(4):691-700.

68. **Sugiyama H.** 1980. Clostridium botulinum neurotoxin. Microbiol Rev 44(3):419-448.

69. **Sutton RB, Ernst JA, and Brunger AT.** 1999. Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. J Cell Biol 147(3):589-598.

70. **Sutton JM, Wayne J, Scott-Tucker A, O'Brien SM, Marks PM, Alexander FC, Shone CC, and Chaddock JA.** 2005. Preparation of specifically activatable endopeptidase derivatives of Clostridium botulinum toxins type A, B, and C and their applications. Protein Expr Purif 40(1):31-41.

71. **Svennerholm L.** 1957. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. Biochim Biophys Acta 24(3):604-611.

72. **Swaminathan S, and Eswaramoorthy S.** 2000. Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B. Nat Struct Biol 7(8):693-699.

73. **Swaminathan S, and Eswaramoorthy S.** 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of Clostridium botulinum neurotoxin type B. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 8): 1024-1026.

74. **Truong DD, and Jost WH.** 2006. Botulinum toxin: clinical use. Parkinsonism Relat Disord 12(6):331-355.

75. **Tsukamoto K, Kohda T, Mukamoto M, Takeuchi K, Ihara H, Saito M, and Kozaki S.** 2005. Binding of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins. J Biol Chem 280(42):35164-35171.

76. **Tucker WC, Edwardson JM, Bai J, Kim HJ, Martin TF, and Chapman ER.** 2003. Identification of synaptotagmin effectors via acute inhibition of secretion from cracked PC12 cells. J Cell Biol 162(2):199-209.

77. **Umeda K, Seto Y, Kohda T, Mukamoto M, and Kozaki S.** 2009. Genetic

characterization of Clostridium botulinum associated with type B infant botulism in Japan. J Clin Microbiol 47(9):2720-2728.

78. **Verderio C, Bacci A, Coco S, Pravettoni E, Fumagalli G, and Matteoli M.** 1999. Astrocytes are required for the oscillatory activity in cultured hippocampal neurons. Eur J Neurosci 11(8):2793-2800.

79. **Verderio C, Rossetto O, Grumelli C, Frassoni C, Montecucco C, and Matteoli M.** 2006. Entering neurons: botulinum toxins and synaptic vesicle recycling. EMBO Rep 7(10):995-999.

80. **Yamakawa K, Karasawa T, Kakinuma H, Maruyama H, Takahashi H, and Nakamura S.** 1997. Emergence of Clostridium botulinum type B-like nontoxigenic organisms in a patient with type B infant botulism. J Clin Microbiol 35(8):2163-2164.

81. **Yamasaki S, Binz T. Hayashi T. Szabo E. Yamasaki M. Eklund M. Jahn R. and Niemann H.** 1994. Botulinum neurotoxin type G proteolyses the Ala81-Ala82 bond of rat synaptobrevin 2. Biochem Biophys Res Commun 200(2): 829-835.

82. **Yang JT. Wu CS. and Maryinez MH.** 1986. Calculation of protein conformation from circular dichroism. Methods Enzymol 130: 208-269.

83. **Yowler BC, Kensinger RD, and Schengrund CL.** 2002. Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. J Biol Chem 277(36):32815-32819.

84. **Whittaker VP.** 1959. The isolation and characterization of acetylcholine-containing particles from brain. Biochem J 72:694-706