ボツリヌス神経毒素の構造と生理機能^{*1}久保 周一郎^{*2}S. KUBO^{*2}: Structure and physiological function of botulinum toxin

微生物の産生する毒素タンパク質はヒトおよび動物に対する殺傷力が強く、古くからその構造と機能および防圧が研究の対象となってきた。すなわち、その作用が微量で発現することから、(1) 酵素の阻害、特にカスケード反応への関与、(2) 細胞膜の攪乱、(3) イオン輸送の攪乱および(4) 高次生体制御系の攪乱など細胞間および細胞内情報伝達系への関与が予想されてきた。一方、毒素の単離・精製が進み、その構造と機能に関する知見が蓄積されるにつれて、毒素の特異的な作用を積極的に利用し生体機能の解明に役立てる気運が高まりつつある。

ボツリヌス神経毒素は嫌気菌 *Clostridium botulinum* の産生する毒素タンパク質で高次生体制御系を攪乱する。ここでは、本毒素の構造と機能に関する知見をまとめるとともに、本毒素による生体機能の解析への応用について考察する。

1. 毒素の型と菌の分類

ボツリヌス神経毒素は抗原性の相違により A, B, C₁, D, E, F および G の 7 型に分類され、これらの毒性は動物種により感受性が異なる (Table 1)。菌はその産生する毒素の抗原性により分類され、ある一つの菌株は一つの型の毒素だけを産生する。近年、各型精製毒素に対する単クローン性抗体と各型毒素間の交叉反応性が解析され、C₁ および D 型菌の産生する毒素間には多くの共通抗原部位が存在することが明らかになった¹⁾。また、A 型毒素に対する単クローン性抗体が B および E 型毒素とも反応した²⁾。従って、上記の分類が見なおされる可能性がある。なお、C₁ および D 型菌は神経毒素以外の C₂³⁾ および C₃⁴⁾ 毒素を産生する。

Table 1. Classification of *Clostridium botulinum*

Type of		
Clutures (Strains)	Toxin	Susceptible species
A	A	Man, chicken
B	B	Man, horse
C ₁	C ₁ , C ₂ , C ₃	Bird, cattle, mink, sheep
D	D, C ₂ , C ₃	Cattle, sheep
E	E	Man, bird, fish
F	F	Man
G	G	No outbreak

^{*1} 本稿は第29回マイコトキシシン研究会特別講演として述べた内容を改題し、まとめたものである。

^{*2} 日本大学農獣医学部 (〒252 藤沢市亀井野1866)

College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University (Kameino 1866, Fujisawa 252).

2. 毒素の分子構造

ボツリヌス毒素はボツリヌス食中毒、乳児ボツリヌス症および創傷ボツリヌス症の原因毒素であるが、細菌毒素タンパク質のうちでそのきわだった特色は食中毒の経口毒性にある。本毒素は培養液あるいは食品中では毒素-非毒素成分複合体 (progenitor toxin) として存在し、この複合体は低い pH 環境および protease に対し非常に強い抵抗性を示し、経口毒素としての活性を保持する⁵⁾ (Fig. 1)。すなわち、複合体のまま酸性の胃を通過し、小腸上部に至っても protease に抵抗性を示して腸管壁から吸収され⁶⁾、リンパ系を介して血液に移行し、毒素は非毒素成分から解離し⁷⁾、神経-筋接合部に達す。

Fig. 1. Molecular composition of progenitor toxin.

現在、G 型を除く総ての型の神経毒素が精製されている。これらの毒素は分子量約15万の単鎖タンパク質として合成されるが、培養中に endogenous protease により解裂 (nicking) され、重鎖と軽鎖の S-S 結合による2鎖構造をとる。単鎖構造の毒素活性が nicking により数倍~数百倍増加することから、2鎖構造であることが最大毒素活性 ($0.16 \sim 1.86 \times 10^8$ マウス LD_{50}/mg タンパク質) の発現に必要と考えられる。なお、nicking により毒素の立体構造は変化する⁸⁾。Table 2 に各型毒素の分子構成を示す。

各型毒素の重鎖と軽鎖はそれぞれ単離できる。これら重鎖および軽鎖のN末端側の第一構造の一部が解析されているが、各型に共通の配列構造が見られる (Table 3)⁹⁾。重鎖および軽鎖は単独では致死活性を示さないが、両鎖を等モルずつ混合し再会合させると、会合の方法にもよるが 25~30% の収率で元の毒素の 0.1~90% の毒性を再現できる⁹⁾。この再現毒性の低いものは元の毒素

Table 2. Molecular weights of *Clostridium botulinum* toxins

Type (Culture)	Molecular weight		
	Toxin	Heavy chain	Light chain
A (Hall)	145,000	97,000	53,000
B (Lamanna)	167,000	104,000	59,000
C (Stockholm)	141,000	98,000	53,000
C (6813)	144,000	92,000	52,000
D (CB 16)	170,000	110,000	60,000
D (1873)	140,000	85,000	55,000
D (South African)	140,000	(90,000)*	(50,000)*
E (Alaska E 43)	147,000	(102,000)*	(50,000)*
F (Langeland)	155,000	105,000	56,000

* Nicked by trypsin.

Table 3. Primary structure of *Clostridium botulinum*

Heavy chain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Identity (%)
A	P	F	V	N	K	Q	F	N	Y	K	D	P	V	N	G	V	D				74
B	P	V	T	I	N	N	F	N	Y	N	D	P	I	D	N						33
C-ST	—	I	T	I	N	N	F	N	Y	S	D	P	V	D	N	K	N	I	L	Y	47
D-SA	T	W	P	V	K	D	F	N	Y	S	D	P	V	P	V	N	D	I	L	—	100
D-1873	—	W	P	V	K	D	F	N	Y	S	D	P	V	N	D	L	Q	I	L	Y	78
E		P	K	I	N	S	F	N	Y	N	D	P	V	N	D	R	T	I	L	Y	40
Light chain																					
A	A	L	N	D	L	C	I	K	V	N	N	I	D	L	K	F					33
B		A	P	G	I	C	I	D	V	D	N	E	D	L	F	F	I	A	D		36
D-SA	—	—	—	S	T	—	I	Q	V	K	N	N	T	L	P	Y	V	A			100
D-1873	—	—	—	S	T	—	I	K	V	K	N	N	F	L	P	Y	V	D			79
E				K	S	I	C	I	E	I	N	N	G	E	L	F					36

と立体構造を異にする¹⁰⁾。一方、それぞれ型を異にする重鎖および軽鎖から混成体を作出できるが、その毒性は不安定で低く、しかも回収率も悪い。すなわち、重鎖と軽鎖の会合には立体構造上の適合性が必要である。

3. 神経毒素の作用機構

個体、組織および細胞レベルで多くの研究が進められているが、これらの問題はいずれも神経伝達機構、膜現象としての *exocytosis* および *endocytosis*、さらに細胞内情報伝達機構など生命現象の本質にせまる問題と関連する。

1) 神経-筋接合部における作用。電気生理学的研究¹¹⁾および ¹²⁵I 標識A型毒素を用いたラジオオートグラフィー¹²⁾により、毒素は神経-筋接合部の前膜に結合し、アセチルコリン (ACh) の放出を阻害することが明らかになった。この ACh 放出阻害については、神経刺激の伝導による Ca^{2+} の終末内流入阻害¹³⁾あるいは終末内での Ca^{2+} に対する感受性の低下¹⁴⁾に議論が集中している。これらの解析には毒素処理試料の終末内 Ca^{2+} 量の低下、終末の毒素受容体の同定、毒素の細胞内移動の有無および Ca^{2+} 感受性の低下の実体など分子レベルでの実証が必要である。このため、モデル実験としてシナプトゾーム (Syn) および培養細胞が利用されている。

2) 毒素と Syn との反応。毒素は *in vivo* 系では“血液-脳関門”を通過できないので中枢神経系には作用できない。しかし、神経-筋接合部の分離が困難なので、ラット大脳から調製した Syn が毒素の作用機構の研究に使用されている¹⁵⁾。この結果、毒素の Syn への作用発現には、(1) 毒素と Syn との結合、(2) Syn 内への毒素成分の移動、(3) 細胞内代謝系への関与の3段階を含むと考えられている。毒素は Syn と結合し、 K^{+} 刺激による Syn からの ACh の放出を阻害する。この結合の速度論および平衡結合実験から、結合は温度非依存性で 0°C で速やかに起り、しかも Syn 膜上には毒素の重鎖と結合する高親和性 (10^{10} M^{-1} レベル) および低親和性 (10^8 M^{-1} レベル) を示す2種類の受容体の存在が示唆された (Fig. 2)。しかし、これらの受容体は未だ正確には同定されていない。一方、¹⁴C-ACh を予め蓄積させた Syn と毒素との結合による ACh 放出阻害反応および ¹²⁵I 標識毒素-Syn 結合物と抗毒素構成鎖 Fab との反応の温度および時間依存性の解析から次のようなスキームが提出されている (Fig. 3)。すなわち、(A) 毒素は重鎖 (H) を介して温度非依存性に Syn と結合し、毒素の膜内移動が起らない温度条件 (0°C) では抗重鎖 Fab は重鎖と Syn との結合を競争阻害して Syn から毒素を完全に解離させる。一方、抗軽鎖

Fig. 2. Reciprocal plots of free and synaptosomes-bound ^{125}I -toxin.

Fig. 3. Reaction of *Clostridium botulinum* neurotoxin and synaptosomes.

Fab は毒素の解離には関与しないで毒素作用を中和する。膜の流動性の高い温度条件 (37°C) では、(B) に示すように毒素は膜内に移動し、移動に応じて抗構成鎖 Fab の作用は受けにくくなり、Fab による毒素の Syn からの解離あるいは毒性の中和作用は次第に消滅する。(C) には Syn 内に移動した毒素の代謝系への関与が予想されているが、その具体的な分子レベルでの機構は現在不明である。

3) 毒素の細胞内代謝系への関与。現在、細胞内情報伝達系には細胞膜あるいは細胞質タンパク質の Ca^{2+} 依存性リン酸化あるいはアデニレートシクラーゼ系の G タンパク質が関与することが話題となっている。A 型毒素はシビレイの Syn からの Ach 放出系のタンパク質の Ca^{2+} 依存性リン酸化を阻害するという¹⁶⁾。一方、 C_1 型および D 型毒素が Syn および多くの神経細胞の 21-26 KD の G タンパク質を ADP-ribosylation する¹⁷⁾。この活性は C_8 毒素の混入によるという反論もある¹⁸⁾。いずれにしても、ボツリヌス神経毒素による Syn あるいは神経細胞内タンパク質のリン酸化阻害あるいは G タンパク質の ADP-ribosylation と Ach 放出阻害との直接的な関連を明らかにする必要がある。

引用文献

- 1) Oguma, K., Syuto, B., Kubo, S., Iida, H.: "Monoclonal antibodies against bacteria" (Macario, A. J. L. and de Macario, E. C. ed.), p. 159 (1986), Academic Press, New York.
- 2) Hambleton, P., Shone, C. C., Wilton-Smith, P., Melling, P.: "Bacterial proteins toxins" (Alouf, J. E. et al. ed.), p. 449 (1984), Academic Press, London.
- 3) Ohishi, I., Odagiri, Y.: Infect. Immun., **43**, 54 (1984).
- 4) Aktories, K., Frevert, J.: Biochem. J., **247**, 363 (1987).
- 5) Sakaguchi, G., Kozaki, S., Ohishi, I.: "Bacterial proteins toxins" (Alouf, J. E. et al. ed.), p. 435 (1984), Academic Press, London.
- 6) Sugii, S., Ohishi, I., Sakaguchi, G.: Infect. Immun., **16**, 910 (1977).
- 7) Hildebrand, G., Lamanna, G., Heckly, R. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **107**, 284 (1961).
- 8) 首藤文栄, 久保周一: 蛋白質, 核酸, 酵素, **34**, 1342 (1989).

- 9) Syuto, B., Kubo, S.: J. Biol. Chem., **256**, 3713 (1981).
- 10) Syuto, B., Kubo, S.: Molec. Cellul. Biochem., **48**, 25 (1982).
- 11) Brooks, V. B.: J. Physiol., **134**, 264 (1975).
- 12) Black, J. D., Dolly, J. O.: J. Cell. Biol., **103**, 521 (1986).
- 13) Hirokawa, N., Heuser, J. E.: J. Cell. Biol., **88**, 160 (1981).
- 14) Cull-Candy, S. G., Lundh, H., Thesleff, S.: J. Physiol., **260**, 177 (1976).
- 15) Murayama, S., Umezawa, J., Terajima, J., Syuto, B., Kubo, S.: J. Biochem., **102**, 1355 (1987).
- 16) Guitart, X., Egea, G., Solsona, C., Marsar, J.: FEBS Lett., **219**, 219 (1987).
- 17) Matsuoka, I., Sakuma, H., Syuto, B., Kubo, S., Kurihara, K.: J. Biol. Chem., **264**, 706 (1989).
- 18) Rosener, S., Chhatwai, G. S., Akories, K.: FEBS Lett., **224**, 38 (1987).