

称号及び氏名	博士（獣医学）	山本 英之
学位授与の日付	平成24年9月30日	
論文名	ボツリヌス神経毒素軽鎖プロテアーゼのヒト VAMP ファミリータンパク質に対する特異性	
論文審査委員	主査	小崎 俊司
	副査	小森 雅之
	副査	三宅 眞実
	副査	居原 秀

論文要旨

緒言

ボツリヌス神経毒素 (**BoNT**) は、偏性嫌気性グラム陽性桿菌 *Clostridium botulinum* によって産生される極めて致死活性の高いタンパク質毒素として知られている。本菌は産生する毒素の抗原性の違いにより **A~G** の **7** 型に分類されている。ヒトに病原性を示すのは **A**、**B**、**E**、**F** 型菌であり、**C**、**D** 型菌は鳥類や家畜に弛緩性麻痺を特徴とする疾病を引き起こす。**BoNT** は軽鎖 (**LC**) と重鎖 (**HC**) から構成され、**HC** はさらに **N** 末端ドメインと **C** 末端ドメインに二分される。**LC** は亜鉛依存性金属プロテアーゼ活性、**HC** の **N** 末端ドメインは細胞内移行に関わるチャンネルを形成する活性、**HC** の **C** 末端ドメインは受容体結合活性をそれぞれ持つことが知られている。**BoNT** はコリン作動性神経終末に作用し、神経伝達物質放出機構に関与する **SNARE** (**soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor**) タンパク質群を型特異的に切断する。**BoNT/A** および **E** は **SNAP-25** (**synaptosomal-associated protein of 25 kDa**)、**BoNT/B**、**/D**、**/F** および **G** は **VAMP** (**vesicle-associated membrane protein**) **1** および **2**、**BoNT/C** は **SNAP-25** と **Syntaxin** を標的とすることが明らかになっている。本毒素は比較的容易に調製できることから、アメリカ **CDC** (**Centers for Disease Control and Prevention**) によって、バイオテロに使用される危険性が高い病原物質と

してカテゴリーAに分類されている。他方、神経伝達物質の開口放出を特異的に阻害することから、神経系の機能解析を行うための有用なツールとして用いられている。さらに、A型およびB型毒素は神経系への特異な作用により、斜視、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸、片頭痛、脳性麻痺のような種々の神経疾患の治療薬として利用されている。

SNAP-25、**VAMP**、**Syntaxin**には複数のホモログが存在し、それぞれ大きなファミリーを形成している。これまで**BoNT**による**SNARE**タンパク質ファミリーに対する作用についての網羅的な解析を行った報告はない。近年、ヒトゲノム解析が急速に進展し、ヒト全遺伝子の約70%にあたる約**15,000**種に対応するヒト完全長cDNAを含む**Gateway** エントリークローンが作製されている。本研究では、エントリークローン化が完了している**VAMP**ファミリーに属するタンパク質に焦点を合わせ、**BoNT**の**LC (BoNT-LC)**のもつ**SNARE**タンパク質への特異な作用を酵素化学的に解明することを目的とした。

第1章 ヒト**VAMP**ファミリータンパク質の調製と**BoNT-LC**に対する特異性

ヒト**VAMP**ファミリーには**9**種類のタンパク質(**VAMP1/Synaptobrevin1**、**VAMP2/Synaptobrevin2**、**VAMP3/Cellubrevin**、**VAMP4**、**VAMP5**、**VAMP7/Ti-VAMP**、**VAMP8/Endobrevin**、**Sec22b**、**Ykt6**)が知られている。**VAMP**のような膜貫通型タンパク質は可溶性が低く、従来の大腸菌発現系では完全長のタンパク質を調製することは容易ではないと考えられていた。さらに、新規標的タンパク質の**BoNT**による切断部位が不明であるため、本研究では膜貫通部位を含む全領域を発現させる必要があると考えた。種々の発現条件を検討し、低温で発現誘導を行うコールドショックベクターを用いた発現系で発現産物の可溶性の向上が見られた。そこで、制限酵素や**DNA**リガーゼを用いず部位特異的な**DNA**組み換えによって目的遺伝子を発現ベクターに移入できる**Gateway**システムに対応させるために**pCOLD-TF-Gateway-FLAG**(N末端**6×His**タグ、C末端**FLAG**タグ)を構築した。同ベクターを用いることで、膜貫通領域をもつ**VAMP**リコンビナントタンパク質を効率よく回収する方法を確立した。本システムにより、すべてのヒト**VAMP**ファミリータンパク質を調製し、**BoNT-LC/B**、**/D**および**/F**による切断活性を基質の分子量の変化を指標に調べた。**LC/B**および**/F**は**VAMP1**、**2**および**3**を切断したが、**VAMP4**、**5**、**7**、**8**、**Sec22b**および**Ykt6**には活性を示さなかった。**LC/D**の**VAMP1**に対する活性は**LC/B**や**LC/F**と比較して低く、他の**VAMP**ファミリータンパク質に対しては**LC/B**および**LC/F**と同様の活性を示した。

第2章 **BoNT-LC/B**、**/D**および**/F**によるヒト**VAMP**ファミリータンパク質

切断の反応速度論的解析

一定濃度の**LC**を種々の濃度の**VAMP**と反応させ、**SDS-PAGE**後の**CBB**染色像に

基づいて切断産物を定量した。基質濃度に対する相対的バンド強度を指標に各基質に対する LC の親和性 (K_m)、触媒活性 (K_{cat}) および触媒効率 (K_{cat}/K_m) を算出した。各型 LC の VAMP に対する親和性は、LC/B および/F では VAMP3>VAMP1>VAMP2 の順に高く、LC/D では VAMP3>VAMP2>VAMP1 の順であった。一方、触媒効率に関しては LC/B で VAMP3>VAMP1>VAMP2、LC/D および/F で VAMP3>VAMP2>VAMP1 の順に高い効率を有していた。VAMP1 および 2 は神経細胞や内分泌細胞における開口放出調節を行っていることが知られている。VAMP3 は細胞表面のトランスフェリン受容体のリサイクリング、インテグリンの小胞輸送の他、マクロファージにおける腫瘍壊死因子 (TNF- α) の輸送に関与していると考えられている。いずれの型の LC も非神経系 SNARE アイソフォームである VAMP3 に対し、最も高い親和性と触媒効率を有することを明らかにした。VAMP3 が切断されると非神経系において SNARE 複合体が形成できなくなり、構成性および調節性開口放出が阻害されると予想されることから、VAMP3 を介する細胞内小胞輸送経路や膜融合プロセスのメカニズムを解明するためのツールとして LC を利用できる可能性が示唆された。ヒト VAMP3 の切断部位を明らかにするために、VAMP3 を LC/B、/D および/F で処理し、SDS-PAGE により、C 末端側のペプチド断片を分離後、それらの N 末端のアミノ酸配列を調べたところ、それぞれ ⁵⁹FETSA⁶³、⁴³LSELD⁴⁷、⁴²KLSEL⁴⁶であった。これらの結果は、BoNT/B、/D および/F で VAMP1 および 2 を切断した時に見られる C 末端側のペプチドのアミノ酸配列と一致していた。このことから、いずれの型の LC も非常に高い基質選択性を持っていると考えられた。

第 3 章 ヒト VAMP1 の BoNT-LC/D に対する切断耐性の解析

LC/D はヒト VAMP1 に対して、VAMP2 および 3 よりも著しく低い活性を示した。VAMP1、2 および 3 のアミノ酸配列を比較し、BoNT/D による VAMP 切断部位近傍の 3 つのアミノ酸残基に対する VAMP1 点変異体 (E42D、I48M および S81T) を作製して LC/B、/D および/F による切断活性を調べた。VAMP1 I48M に対する LC/D の基質切断活性は劇的に上昇し、野生型よりもはるかに高く、LC/B および/F と同程度であった。切断活性の変化は基質に対する親和性の違いによるものではなく、触媒活性の影響によるものであることを速度論的解析により確認した。これまで D 型毒素に対するサルおよびラットの感受性が他の型の毒素に比べ極めて低いことが知られている。動物種間の VAMP1 アミノ酸配列を比較すると、D 型毒素に対して耐性を示すヒト、サルおよびラットでは 48 残基目のアミノ酸残基はイソロイシンであるのに対し、ウシやマウスではメチオニンである。従って、48 残基目のアミノ酸残基が LC/D に対する切断耐性を決定付けていると考えられた。

総括

1. BoNT-LC/B、/D および/F は VAMP1、2 および 3 を切断したが、LC/D の VAMP1 に対する活性は著しく低かった。いずれの型の LC もその他の VAMP ファミリータンパク質 (VAMP4、5、7、8、Sec22b および Ykt6) には活性を示さなかった。
2. いずれの型の LC も VAMP3 に対して、最も高い親和性と触媒効率を持つことを反応速度論的解析により明らかにした。LC は VAMP3 の膜融合機構を解明するためのツールとして利用が可能であることが示唆された。
3. LC/B、/D および/F は、それぞれ非常に高い基質選択性を有し、VAMP1 および 2 と同一部位で VAMP3 を切断することを明らかにした。
4. ヒト VAMP1 の LC/D に対する切断耐性は 48 残基目のアミノ酸残基に起因すると考えられた。

審査結果の要旨

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) は、偏性嫌気性グラム陽性桿菌 *Clostridium botulinum* によって産生される極めて致死活性の高いタンパク質毒素として知られている。本菌は産生する毒素の抗原性の違いにより A~G の 7 型に分類されている。ヒトに病原性を示すのは A、B、E、F 型菌であり、C、D 型菌は鳥類や家畜に弛緩性麻痺を特徴とする疾病を引き起こす。BoNT は軽鎖 (LC) と重鎖 (HC) から構成され、LC は亜鉛依存性金属プロテアーゼ活性、HC の N 末端ドメインは細胞内移行に関わるチャンネルを形成する活性、HC の C 端ドメインは受容体結合活性をそれぞれ持つことが知られている。BoNT はコリン作動性神経終末に作用し、神経伝達物質放出機構に関与する SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) タンパク質群を型特異的に切断する。BoNT/A および/E は SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa)、BoNT/B、/D、/F および/G は VAMP (vesicle-associated membrane protein)、BoNT/C は SNAP-25 と Syntaxin を標的とすることが明らかになっている。SNAP-25、VAMP、Syntaxin には複数のホモログが存在し、それぞれ大きなファミリーを形成している。これまで BoNT による SNARE タンパク質ファミリーに対する作用についての網羅的な解析を行った報告はない。近年、ヒトゲノム解析が急速に発展し、ヒト全遺伝子の約 70%にあたる約 15,000 種に対応するヒト完全長 cDNA を含む Gateway エントリークローンが作製されている。本研究では、エントリークローン化が完了している VAMP ファミリーに属するタンパク質に焦点を合わせ、BoNT の LC (BoNT-LC) のもつ SNARE タンパク質への特異な作用を酵素化学的に解明することを

目的とした。

第1章では、ヒト **VAMP** ファミリーに属する **9** 種類のタンパク質(**VAMP1**、**VAMP2**、**VAMP3**、**VAMP4**、**VAMP5**、**VAMP7/Ti-VAMP**、**VAMP8/Endobrevin**、**Sec22b**、**Ykt6**) および **LC** のリコンビナントタンパクの調製を行った。**VAMP** のような膜貫通型タンパク質は可溶性が低く、従来の大腸菌発現系では完全長のタンパク質を調製することは容易ではないと考えられていた。種々の発現条件を検討し、低温で発現誘導を行うコールドショックベクター **pCOLD-TF-Gateway-FLAG** (**N** 末端 **6** × **His** タグ、**C** 末端 **FLAG** タグ)を用いた発現系で発現産物の可溶性の向上が見られ、すべてのヒト **VAMP** ファミリータンパク質を調製した。これら **VAMP** に対して、**LC/B**、**/D** および **/F** は **VAMP1**、**2** および **3** を切断したが、**LC/D** の **VAMP1** に対する活性は低かった。これら **LC** は **VAMP4**、**5**、**7**、**8**、**Sec22b**、**Ykt6** に活性を示さなかった。

第2章では、**LC/B**、**/D** および **/F** によるヒト **VAMP** ファミリータンパク質切断の反応速度論的解析を行うため、一定濃度の **LC** を種々の濃度の **VAMP** と反応させ、**SDS-PAGE** の **CBB** 染色像から切断産物を定量した。各基質に対する **LC** の親和性 (**K_m**)、触媒活性 (**K_{cat}**) および触媒効率 (**K_{cat}/K_m**) を算出したところ、各 **LC** は **VAMP3** に対して最も高い親和性および触媒効率を示した。**VAMP1** および **2** は神経細胞や内分泌細胞における開口放出調節に関与しているが、**VAMP3** は非神経系 **SNARE** タンパク質として細胞表面のトランスフェリン受容体のリサイクリング、インテグリンの小胞輸送などに関与していることから、**LC** は細胞内小胞輸送経路メカニズムの解明するためのツールとして利用できること示唆された。**LC/B**、**/D** および **/F** の **VAMP3** 切断片の **N** 末端アミノ酸配列は、それぞれ **59FETSA63**、**43LSELD47**、**42KLSEL46** であり他の **VAMP** 切断部位と一致した。

第3章では、**LC/D** によりヒト **VAMP1** に対する耐性を調べるために、**VAMP1** 切断部位近傍の **3** つのアミノ酸残基に対する **VAMP1** 点変異体 (**E42D**、**I48M** および **S81T**) を作製した。**VAMP1 I48M** に対する **LC/D** の基質切断活性は劇的に上昇し、野生型よりもはるかに高く、**LC/B** および **/F** と同程度であった。この切断活性の変化は基質に対する親和性の違いによるものではなく、触媒活性の影響によるものであることを速度論的解析により確認した。

本研究は、**LC** の **VAMP** ファミリーに対する基質特異性および酵素化学的特徴を明らかにし、ヒトおよびサル の **BoNT/D** に対する耐性は **VAMP1** の **48** 残基目のアミノ酸残基の変異によることを示した。さらに非神経系の細胞内小胞輸送メカニズムを解明するために、**LC** が実用的なツールになることを示した。これら一連の研究成果は、ボツリヌス毒素研究の新たな展開を示唆するものであり、獣医感染症学の分野ばかりでなく医学領域にも大きく貢献すると考えられる。したがって、最終試験の成績と併せて博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。