



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ボツリヌスC型毒素の構造とレセプターへの結合
Author(s)	安居院, 高志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第2022号
Issue Date	1984-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32728
Type	doctoral thesis
File Information	2022.pdf



ボツリヌスC型毒素の構造と
レセプターへの結合

家畜生化学講座

安居院高志

目 次

略語表	4
緒 言	6
第1章 ボツリヌスC型毒素のラット脳シナ プトゾームへの結合	9
要 旨	10
序 文	12
材料および方法	13
結 果	
¹²⁵ I-毒素のシナプトゾームへの結合の温 度依存性	21
2種類の毒素レセプターの存在	21
¹²⁵ I-毒素のシナプトゾーム内への侵入	25
抗体による ¹²⁵ I-毒素のシナプトゾームへ の結合の阻止	27
考 察	29
第2章 ボツリヌスC型毒素に対する単クロー ン性抗体の作製および抗体の性状	34
要 旨	35
序 文	36
材料および方法	37
結 果	
単クローン性抗体の作製	43
単クローン性抗体の性状	43

考 察	52
第 3 章 ボツリヌス C 型毒素分子上のラット 脳シナプトソームおよびガングリオ シド GT1b 結合部位と単クローン性抗 体に対する抗原決定部位との関係	55
要 旨	56
序 文	58
材料および方法	60
結 果	
単クローン性抗体による ^{125}I -毒素のシナ プトソームへの結合の阻止	61
単クローン性抗体による ^{125}I -毒素とガン グリオシド GT1b との結合の阻止	61
単クローン性抗体に対する抗原決定部位	67
考 察	71
第 4 章 ボツリヌス C 型毒素重鎖のトリプシ ン限定分解によるフラグメントの作 製およびフラグメントと単クローン 性抗体、ラット脳シナプトソーム、 ガングリオシド GT1b との反応につい て	75
要 旨	76
序 文	77
材料および方法	78
結 果	

トリプシン限定分解による重鎖からのフ ラグメントの作製-----	81
H ₆ フラグメントと単クローン性抗体との 反応-----	85
毒素構成成分のシナプトソームおよび G _{T1b} への結合-----	89
考 察-----	93
総 括-----	97
謝 辞-----	101
文 献-----	102
英文抄録-----	110

略 語 表

Ach	アセチルコリン
B _{max}	最大結合量
B-Nap	KOLTHOFF の緩衝液 (50 mM Borax 55 ml と 100 mM NaH ₂ PO ₄ 45 ml との混 合液、pH 8.0)
BSA	ウシ血清アルブミン
C-ST	<u>Clostridium botulinum</u> C 型 Stockholm 株
D-1873	<u>Clostridium botulinum</u> D 型 1873 株
DME-0	FCS を含まない Dulbecco-modified Eagle 培地
DME-10	10 % FCS を含む DME 培地
DME-20	20 % FCS を含む DME 培地
D-SA	<u>Clostridium botulinum</u> D 型 South African 株
ELISA	酵素免疫測定法 (固相法)
ELISA 緩衝液	0.5 % BSA、0.05 % Tween 20、 0.02 % NaN ₃ を含む PBS
FCS	ウシ胎児血清
HAT-DME-20	1×10^{-4} M ヒポキサンチン、 4×10^{-7} M アミノプテリン、 1.6×10^{-5} M チミ ジンおよび 20 % FCS を含む DME

	培地
ID ₅₀	50% 阻止量
IF	ゲル等電点分離法
I _g	免疫グロブリン
Inc. m.	3 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 180 mM NaCl, 10 mM ブドウ糖を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝 液 (pH 7.2)
Iso. m.	0.32 M ショ糖, 1 mM EDTA ナト リウムを含む 10 mM トリスー塩酸 緩衝液 (pH 7.4)
K _a	結合定数
K _d	解離定数
2-ME	2-メルカプトエタノール
MLD	最小致死量
M.W.	分子量
NSHP	N-スクシミジル 3-(4-ヒ ドロキシフェニル) プロピオン 酸
PBS	リン酸緩衝生理食塩水 (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na ₂ HPO ₄ , 0.02% KH ₂ PO ₄ , pH 7.2)
SDS-PAGE	ドデシル硫酸ナトリウムーポリ アクリルアミドゲル電気泳動

緒言

ボツリヌス毒素は抗原性の相違により A~G 型に分類されている。しかし、これらの毒素は、型間の相違にかかわらず、分子量約 10 万の重鎖と約 5 万の軽鎖が S-S 架橋で結合した分子量約 15 万の単純タンパク質であり、⁽³⁷⁾神経筋接合部におけるアセチルコリン（以下 Ach と略す）の放出を阻害し、動物の筋麻痺、呼吸困難による斃死をもたらす。⁽⁵⁾

ボツリヌス毒素の作用部位および作用機構は近年主に A 型毒素を使用して研究されてきた。すなわち、in vivo および in vitro における薬理的あるいは形態学的研究から、作用部位は神経筋接合部であることが再確認された。ZACKS ^(49, 50)らおよび HIROKAWA と KITAMURA ⁽¹²⁾はボツリヌス毒素が神経筋接合部に局在して結合することを示した。また CULL-CANDY ⁽⁶⁾らは、毒素によって減少した微小終板電位の頻度および大きさが反復神経刺激（15 Hz、4 時間）、Black widow spider venom、カルシウムイオノフォア A23187 および神経終末のガラス電極による物理的損傷等で増加するが、外液カルシウムを通常より高濃度（10 mM）にした時に初めて対照と同程度の値を示すことから、ボツリヌス毒素の作用機構は神経終末内でのカルシウムイオンに対する感受性の低下であると結論した。

WHITTAKER ⁽⁴⁴⁾らにより、モルモット脳よりシナプト

ゾームが初めて分離されて以来、ボツリヌス毒素の作用機構の研究にもシナプトゾームが用いられるようになった。HABERMANN⁽⁸⁾は¹²⁵I-ボツリヌスA型毒素がシナプトゾームに特異的に結合することを明らかにした。また、WONNACOTTとMARCHBANKS⁽⁴⁷⁾はボツリヌスA型毒素が高濃度カリウム刺激によるシナプトゾームからの¹⁴C-Ach放出を阻害すること、さらにWONNACOTT⁽⁴⁸⁾らはボツリヌス毒素がシナプトゾームの⁴⁵Caの取り込みを阻害することを示し、Ach放出阻害は外液カルシウムイオンの取り込みの阻害によると結論した。一方、HIROKAWAとHEUSER⁽¹³⁾は神経終末のミトコンドリア内のカルシウムによる高電子密度顆粒がボツリヌス毒素処理の試料では消失することを観察し、上記WONNACOTTの説を支持した。しかし、ボツリヌス毒素のAch放出阻害の詳細な分子レベルでの解明はいまだなされていない。

SIMPSON^(31, 33, 34)は、同じ細菌外毒素であるジフテリヤ毒素作用を参考にボツリヌス毒素の作用を三段階に分けた。すなわち、レセプターへの結合、細胞内への移行、細胞内での触媒的作用である。レセプターへの結合は非常に速く、温度に依存しない。これは本論文の第一章でも確認された。細胞内への移行は温度に依存性であり、次の諸現象から支持されている。すなわち、結合は非常に速いにも

かかわらず毒素の発現までに遅れを生ずること、また、毒素がレセプターに結合し時間が経過した場合、もはや抗毒素で毒素作用を中和できないこと^(30, 32)などである。細胞内での触媒的作用についてはこれを支持する直接的証拠はないが、毒作用発現の最終段階で、Ach のカルシウム依存性開口放出に関与するタンパク質群に作用するものと考えられる。

本論文はこの SIMPSON の仮説におけるボツリヌス毒素の毒作用の最初の段階であるレセプターへの結合に関連したものである。第一章では¹²⁵I- 標識した毒素のラット脳シナプトゾームへの結合様式を明らかにし、第二章では結合段階の解明に有効な手段となる単クローン性抗体の作製について述べ、第三章では毒素分子上の単クローン性抗体に対する抗原決定部位と、レセプターの結合部位との関連について考察し、最後に第四章では毒素のトリプシン限定分解により単クローン性抗体に対する抗原決定部位を含むフラグメントを作製し、このフラグメントのラット脳シナプトゾームおよびガングリオシド GT1b への結合について述べた。

第 1 章

ボツリヌス C 型毒素のラット脳
シナプトゾームへの結合

要 旨

Clostridium botulinum C 型 Stockholm 株の毒素を ^{125}I -標識し、ラット脳シナプトゾームとの結合について調べ、次の結果を得た。

^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は10分間で平衡に達し、 0°C と 37°C では相違はみられなかった。 ^{125}I -毒素とシナプトゾームとの 0°C 、10分間での平衡結合実験により、シナプトゾーム膜上に2種類のレセプターの存在が示唆され、その結合定数 (K_a) および最大結合量 ($B_{\max}$) は、高親和性のものでは $1.05 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $5.26 \times 10^{13} \text{ mol/mg}$ シナプトゾームタンパク質、低親和性のものでは $5.00 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、 $5.00 \times 10^{12} \text{ mol/mg}$ シナプトゾームタンパク質であった。

^{125}I -毒素をあらかじめ 0°C でシナプトゾームに結合させた後、 0°C および 37°C で再びインキュベーションを続け、所定時間に過剰の未標識毒素を加えて結合した ^{125}I -毒素を解離させた。その結果 37°C で再インキュベーションした場合、そのインキュベーション時間に応じて解離されない ^{125}I -毒素量が増加し、最終的に結合した ^{125}I -毒素量の約0.4% がシナプトゾームから解離しなかった。このことは結合した ^{125}I -毒素の一部が 37°C ではシナプトゾーム膜内あるいはシナプトゾーム内に侵入することを示唆する。

^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は抗重鎖抗体によって抗毒素および抗軽鎖抗体に比べ強く阻止された。このことから、毒素のシナプトゾームへの結合は重鎖によることが明らかとなった。

序 文

ボツリヌス毒素の神経筋接合部への作用の第一段階は、毒素の運動神経終末形質膜への結合である。この結合については神経筋標本を用いて、組織化学的あるいは電気生理学的手法で研究がなされてきた。

脳より分離されるシナプトゾームは、神経筋接合部の運動神経終末部の分離が困難なことから、これの代用モデルとしてボツリヌス毒素の作用の研究に汎用されてきた。しかし、これらはいずれもヘムアグルチニン活性を含むA型毒素を用いた研究であった。C型毒素についてはSYUTOとKUBO⁽³⁸⁾が初めて精製し、さらに重鎖と軽鎖に分離しておのおののアミノ酸分析が行われ、また、分離した重鎖と軽鎖⁽⁴⁰⁾から毒性を有する元の毒素が再構成されている。したがって、この章では分子構造がよく研究されたC型毒素を¹²⁵I-標識し、ラット脳シナプトゾームとの結合様式について述べた。

材料および方法

菌株

Clostridium botulinum C型 Stockholm 株（以下 C-ST と略す）は国立予防衛生研究所、坂口玄二博士（現大阪府立大学農学部）より分与を受けた。

Clostridium botulinum D型 1873 株（以下 D-1873 と略す）および South African 株（以下 D-SA と略す）は北海道大学医学部飯田広夫教授より分与を受けた。

それぞれの菌株の培養は STERN と WENTZEL⁽³⁶⁾ の透析培養法を一部改良した SYUTO と KUBO⁽³⁸⁾ の方法によった。

毒素の精製

それぞれの菌株の培養上清からの毒素の精製は DEAE-セルローズ（Brown, USA）、QAE-セファデックス A-50、セファデックス G-200（以上 Pharmacia, Sweden）カラムクロマトグラフィーを用いた SYUTO と KUBO⁽³⁸⁾ の方法によった。

毒力測定

毒力は BOROFF と FLECK⁽⁴⁾ の方法に準じて行った。約 20g の dd 系マウスの尾静脈に、0.1M リン酸緩衝液（pH 6.9）で希釈した試料 0.1ml を注射し、注射後の生存時間から毒力を求めた。最小致死量（以下 MLD と略す）と生存時間の相関曲線は図 1-1 に示した通りである。

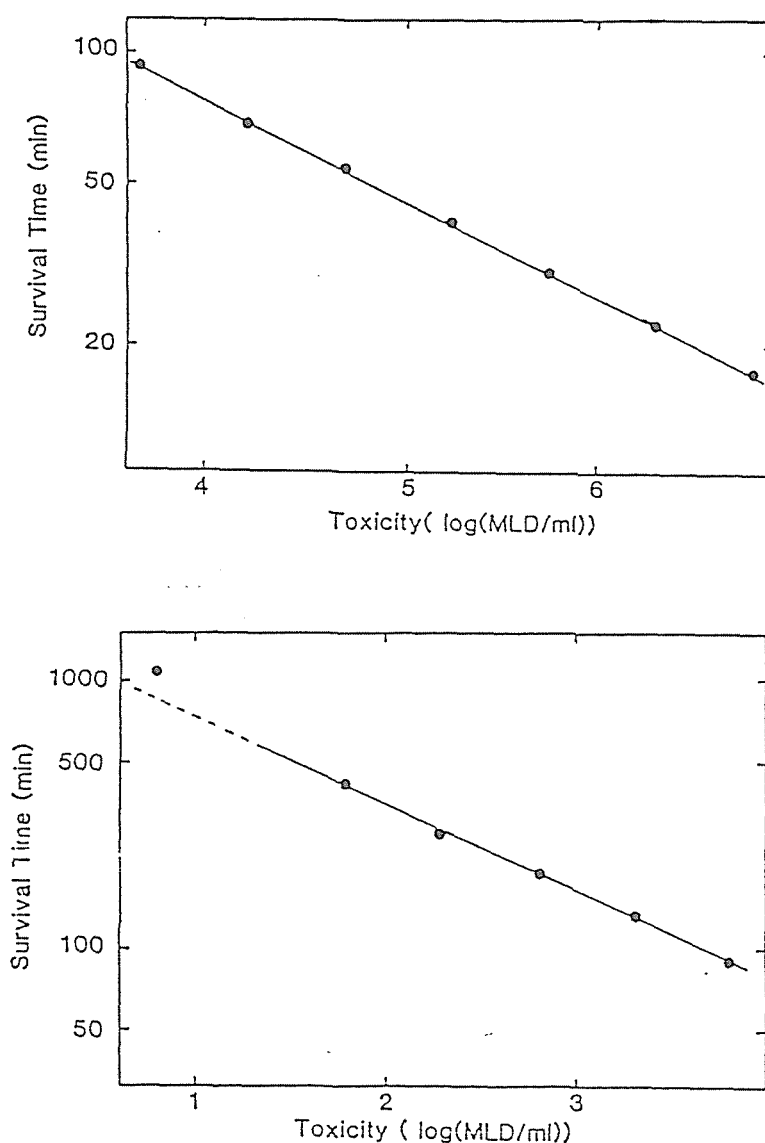


図 1-1 毒素 - 生存時間曲線

C-ST毒素を100mMリン酸緩衝液 (pH 6.9) に種々の濃度に溶解し、dd系マウス (体重約 20 g) に100 μ l ずつ尾静脈内注射し、各濃度の毒素液の注射後の生存時間を測定して、毒力と生存時間の関係を作図した。なお、マウスは1群6匹ずつ使用し、6匹の生存時間の算術平均値をその濃度における生存時間とした。

毒素の重鎖および軽鎖の分離・精製

毒素からの重鎖および軽鎖の分離・精製は SYUTO⁽⁴⁰⁾ と KUBO の方法を一部改良して行った。

精製した C-ST毒素 10 mg を QAE セファデックス A-50 カラム (1.2×10 cm) に吸着させ、50 mM のジチオスレイトール 15 ml を流し、S-S 架橋を切断後、50 mM ヨードアセトアミド 15 ml を流し、遊離の SH 基を塞いだ。KOLTHOFF の緩衝液 (50 mM Borax 55 ml と 100 mM NaH_2PO_4 45 ml との混合液、pH 8.0、以下 B-Nap と略す) で十分洗った後、5% 2-メルカプトエタノール (以下 2-ME と略す) を含む B-Nap を流し、約 3 時間放置し、再び 5% 2-ME を含む B-Nap 36 ml で軽鎖を溶出し、溶出液を 6 ml ずつ集めた。次に 100 mM NaCl、5% 2-ME を含む B-Nap 36 ml で未解離の毒素を、さらに、200 mM NaCl、5% 2-ME を含む B-Nap 36 ml で重鎖を溶出し、溶出液を 6 ml ずつ集めた。各画分について 5% 2-ME 存在下でドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下 SDS-PAGE と略す) を行いタンパク質の溶出パターンを調べ、重鎖および軽鎖だけを含む画分を集め、B-Nap に対し十分透析し保存した。

D-1873 毒素の重鎖および軽鎖の分離・精製法は C-ST 毒素の場合と同様に行った。ただし、D-1873 毒素の場合、未解離の毒素の溶出には 80 mM NaCl

5% 2-ME を含む B-Nap 36 ml を使用した。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は WEBER ら⁽⁴³⁾の方法を一部改良して行った。0.5×10 cm のガラスカラム中に7.5% アクリルアミドゲル(モノアクリルアミド:ビスアクリルアミド、29.1:0.9)を作製し、1% SDS、20% グリセリンを含む B-Nap 中で100°C 3分間熱処理した試料を添加し、ゲル1本あたり8mAで電気泳動を行った。電極液は0.1% SDS を含む100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)を用いた。泳動後ゲルを0.1% クーマシーブリアントブルー R-250、50% メタノール、10% 酢酸混液で40°C、1時間染色し、10% 酢酸、10% メタノール混液で脱色した。

タンパク質量の測定

毒素のタンパク質量については中性溶液における波長278nmの吸光度から求めた。吸光係数は次の値を用いた。すなわち C-ST 毒素 $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 14.18$ 、C-ST 毒素重鎖 $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 12.02$ 、C-ST 毒素軽鎖 $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 9.03$ 、D-1873 毒素 $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 11.4$ 、D-1873 毒素重鎖 $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 16.1$ 、D-1873 毒素軽鎖 $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 9.59$ であった。なお、D-SA 毒素については C-ST 毒素のそれを代用した。

他のすべてのタンパク質量の測定にはウシ血清アルブミン(以下 BSA と略す)を標準タンパク質として使用し、LOWRY⁽²¹⁾らの方法によった。

毒素の ^{125}I -標識

毒素の ^{125}I -標識は BOLTON と HUNTER⁽³⁾の方法によった。N-スクシミジル 3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸 (Sigma, USA) (以下 NSHP と略す) をクロロミンT 存在下で $2\text{mCi Na}^{125}\text{I}$ (New England Nuclear, USA) により ^{125}I -標識した。これをベンゼンで抽出し、ベンゼンを蒸発させた後、B-Nap に溶解した C-ST 毒素 $30\sim 40\ \mu\text{l}$ ($6\ \mu\text{g}$) を添加し、 0°C で 30 分間 インキュベートした。200mM グリシン B-Nap 溶液 $500\ \mu\text{l}$ を加え、さらに 0°C で 5 分間 インキュベートして反応を停止させ、セファデックス G-50 カラム ($1 \times 20\text{ cm}$) クロマトグラフィーにより ^{125}I -毒素と未結合のヨード化 NSHP とを分離した。 ^{125}I -毒素の比放射能は $2\sim 5\text{ Ci/g}$ であり、その毒性は $25\sim 35\%$ に減少した。 ^{125}I -毒素を 5% 2-ME 存在下で SDS-PAGE を行ったところ、 ^{125}I は重鎖に 36% 、軽鎖に 64% 分布した。

抗毒素、抗重鎖、抗軽鎖抗体の調製

C-ST 株の培養上清を 0.5% ホルマリンを含む B-Nap で 37°C で 6 回透析を行いトキシイド化した後、B-Nap で 2 回透析してホルマリンを除いた。このトキシイドに等量のフロイントのコンプリートアジュバントを加え、ウサギ皮内に免疫した。一ヶ月後、同量の抗原を追加免疫し、さらに一週間後に耳静脈より 50 ml の血液を採取し血清を得た。

この血清を C-ST ヘムアグルチニン結合セファローズ 4B カラム (1×4 cm) に通し、素通り画分をさらに C-ST 毒素結合セファローズ 4B カラム (1×4 cm) に通し、リン酸緩衝生理食塩水 (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na_2HPO_4 , 0.02% KH_2PO_4 , pH 7.2, 以下 PBS と略す) で十分洗浄後、3 M KSCN で抗毒素抗体を溶出した。

抗重鎖および抗軽鎖抗体については上記血清より、毒素結合セファローズ 4B カラムの代わりに、それぞれ重鎖結合および軽鎖結合セファローズ 4B カラムを (1×4 cm) を用い、同様に精製した。

シナプトゾームの調製

ラット脳からのシナプトゾームの調製は WHITTAKER⁽⁴⁴⁾の方法を一部改良して行った。ラット大脳 (3 匹分) を 45 ml の 320 mM ショ糖、1 mM EDTA ナトリウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) (以下 Iso. m. と略す) 中で Potter-Elvehjem 型テフロンホモゲナイザー (クリアランス 0.1 mm) で 800 回転、2 回上下してホモゲナイズした。これを遠心 ($1,500 \times g$, 15 分間) 分離後、沈渣は再度上記と同様にホモゲナイズおよび遠心分離し、上清を先の上清と合わせて、 $19,000 \times g$, 15 分間遠心分離した。沈渣を 6 ml の Iso. m. に懸濁し、0~20% Ficoll 400 (Pharmacia, Sweden) のリニアグラジエント上に重層し、インターナショナル B60 超遠心機、488 スイングローターで $100,000 \times g$, 1 時間遠心分離し、9.1~11.4% Ficoll 画分を集め、2 倍量の Iso. m. を

加え、遠心 ($77,000 \times g$, 30 分間) 分離し、シナプトゾーム画分とした。

シナプトゾームの保存

調製したシナプトゾーム懸濁液に 10% ジメチルスルフォオキシドを加え、 -80°C で保存した。この操作により ^{14}C -コリンの取り込み量は調製直後のそれに比べ 70% に減少したが、少なくとも 6 ヶ月間この活性に変化はなかった。また、凍結融解後のシナプトゾームは高濃度カリウム刺激により ^{14}C -Ach を放出し、生物学的活性は保持されていることが確かめられた。

^{14}C -コリンのシナプトゾームへの取り込み

シナプトゾームの ^{14}C -コリン取り込みについては HAGA⁽⁹⁾ の方法に準じて行った。シナプトゾーム 4 mg (タンパク質量) を 3 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 , 180 mM NaCl, 10 mM ブドウ糖を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) (以下 Inc. m. と略す) 1 ml に懸濁し、[メチル- ^{14}C] 塩化コリン ($199 \mu\text{Ci/ml}$, Amersham, England) $5 \mu\text{l}$ を添加し、 37°C 、30 分間インキュベート後、 0°C の Inc. m. を 5 ml 添加して取り込みを止めた。反応液を $11,000 \times g$ 、20 分間遠心分離し、沈渣を Inc. m. で洗い、7 ml の酸性エタノール抽出液 (95% エタノール、0.2% 酢酸、 $100 \mu\text{M}$ ネオスチグミン、 1.5 mM Ach および水) を加え、ダウンス型ホモゲ

ナイザータイプAでよくホモゲナイズした。ホモジネートを氷中で10分間放置した後、 $11,000 \times g$ で15分間遠心分離した。上清 $300 \mu\text{l}$ に対してPCSシンチレーター (Amersham, England) 10ml を加えて、放射活性を測定した。

^{14}C -Ach のシナプトゾームからの放出

^{14}C -Achの放出についてはHAGA⁽⁹⁾およびWONNACOTT⁽⁴⁷⁾とMARCHBANKSの方法に準じて行った。前述の ^{14}C -コリンを取り込ませたシナプトゾームを遠心分離して集め、2回洗い、 25mM KClを含むInc.m (塩濃度はNaClの量を減らすことで補正) およびInc.m.に懸濁し、 37°C でインキュベートし、経時的にGF/cフィルター (Whatman, England) でろ過し、そのろ液にPCSシンチレーターを加え、放射活性を測定した。

^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合

^{125}I -毒素と $100 \mu\text{g}$ (タンパク質量) のシナプトゾームとを 0.1% のBSAを含むInc.m. 1ml 中でインキュベートし、Whatman GF/cフィルター (直径 8mm) でろ過し、 0°C のInc.m.で十分洗浄後、フィルター上に残った放射活性をγ線測定器 (LKB-Minigamma, LKB, Sweden) で測定した。非特異的な ^{125}I -毒素の結合量の測定は過剰量の未標識毒素 ($242 \mu\text{g}$) の存在下で同様操作したものより求めた。

結 果

 ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合の温度依存性

図1-2は ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合を 0°C (●—●) および 37°C (○—○)で行ったものである。図からも明らかなように ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は温度に依存せず、10分以内に平衡に達するきわめて速い反応であった。 ^{125}I -毒素は 26.5 ng ($223,650\text{ cpm}$) 用い、結合した ^{125}I -毒素の放射活性は 0°C 、10分間で $38,548\text{ cpm}$ 、 37°C 、10分間で $36,393\text{ cpm}$ であった。また、10分後の非特異的結合は 0°C および 37°C ともに総結合量の22～23%にとどまった。

2種類の毒素レセプターの存在

図1-3は ^{125}I -毒素をあらかじめ 0°C 、10分間シナプトゾームとインキュベートし結合させた後、種々の量の未標識毒素を添加し、 0°C 、10分間インキュベートし、レセプターに結合した毒素を解離させたものである。これより、 ^{125}I -毒素のシナプトゾーム上のレセプターへの結合は未標識毒素により拮抗的に解離させられることがわかった。

図1-4は一定量のシナプトゾーム(タンパク質量、 $100\mu\text{g}$)に対し、種々の濃度の ^{125}I -毒素をインキュベートし、結合および未結合の ^{125}I -毒素量を求め、それぞれを逆数プロットしたものである。図中の挿入図BはA図の ^{125}I -毒素の高濃度領域を拡大

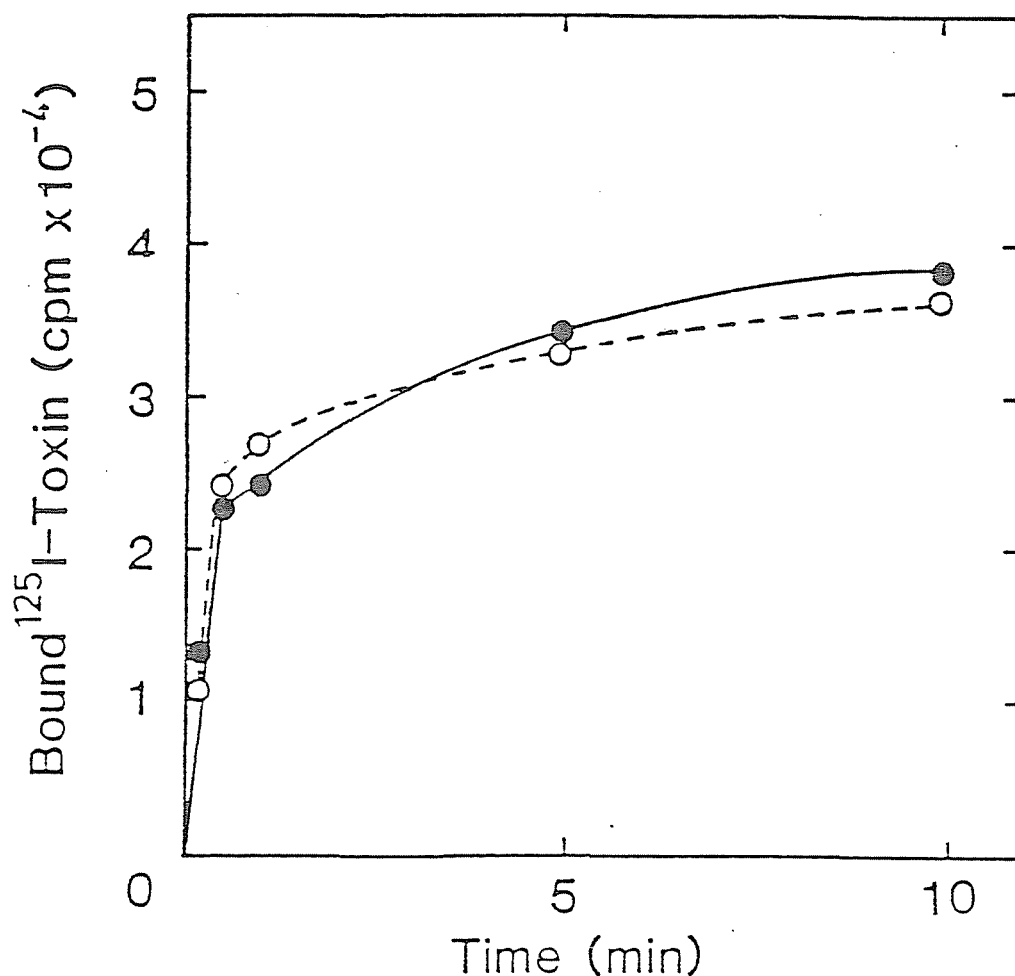


図 1-2 ^{125}I -毒素の 0°C および 37°C でのシナプトゾームへの結合

26.5 ng の ^{125}I -毒素を $100\mu\text{g}$ タンパク質量のシナプトゾームと 1 ml の Inc. m. 中で 0°C (●—●) および 37°C (○--○) で所定時間インキュベートした。反応液を Whatman GF/c フィルターでろ過し、Inc. m. で十分洗浄後、フィルター上に残った放射活性を測定した。過剰量の未標識毒素 ($242\mu\text{g}$) を加えて同様に行ったものを非特異的結合とし、すべての値からこれを差し引いた。

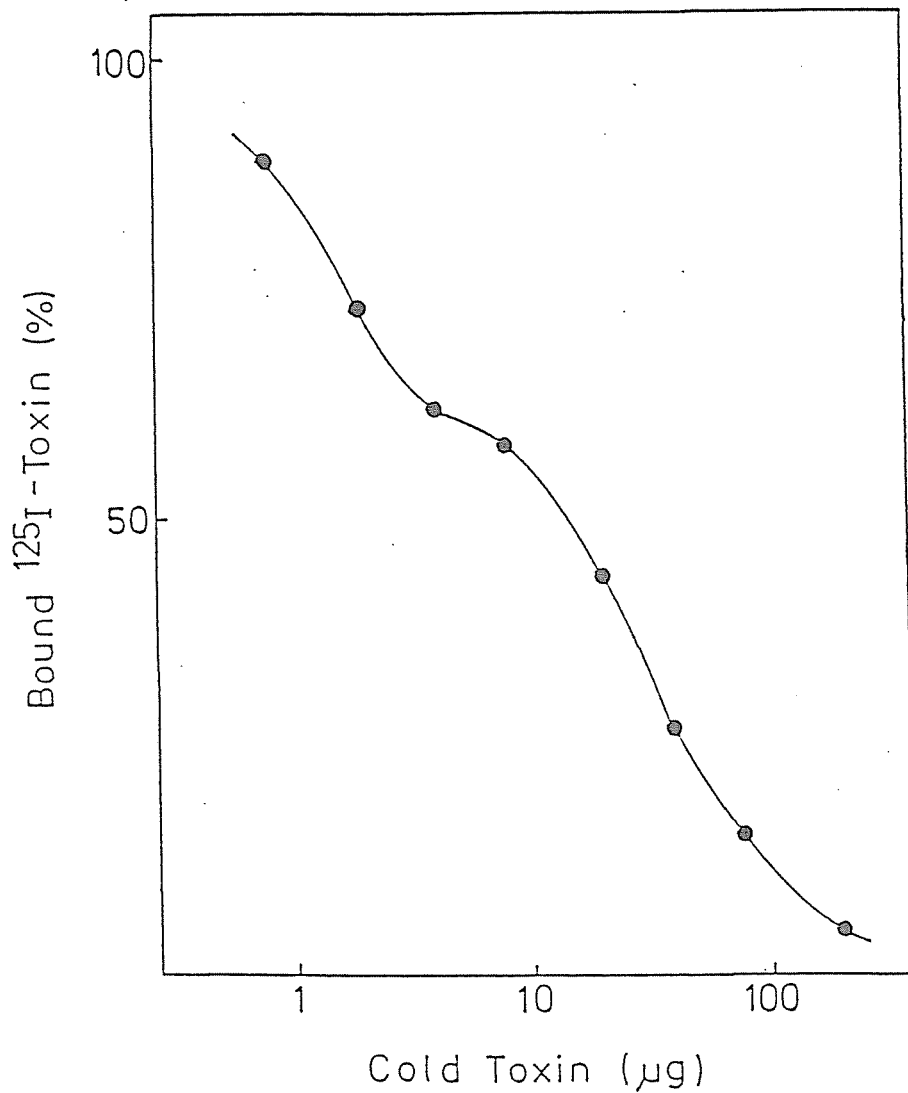


図 1-3 シナプトゾームに結合した ^{125}I -毒素の未標識毒素による置換

26.5 ng の ^{125}I -毒素をあらかじめ 100 μg タンパク質量のシナプトゾームと 1 ml の Inc. m. 中で 0°C、10 分間インキュベート後、種々の濃度の未標識毒素を加え、さらに 0°C で 10 分間インキュベートし、GF/C フィルターでろ過し、フィルター上に残った放射活性を測定した。

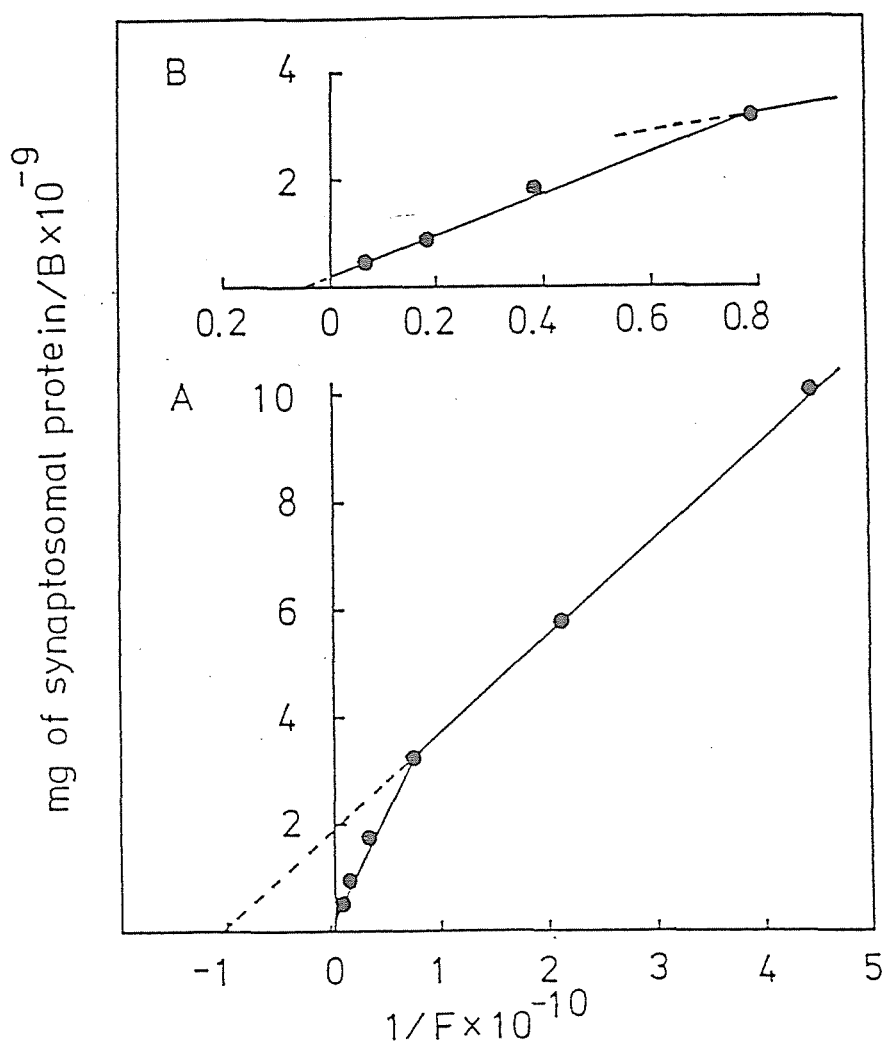


図 1-4 シナプトゾームに結合した ^{125}I -毒素と未結合の毒素との逆数プロット

一定量のシナプトゾーム (タンパク質量 $100\mu\text{g}$) に対し種々の濃度の ^{125}I -毒素を 1ml の Inc. m. 中で 0°C 、10 分間インキュベートし、シナプトゾームに結合した ^{125}I -毒素濃度 (B) と未結合の ^{125}I -毒素濃度 (F) を求め、それぞれを逆数プロットした。

結合 ^{125}I -毒素量は過剰量 ($242\mu\text{g}$) の未標識毒素を加えた時の非特異的結合量を差し引いたものである。挿入図 B は A 図の ^{125}I -毒素の高濃度領域を拡大したものである。

大したものである。この直線が変曲点を持つことからシナプトゾーム膜上には2種類の毒素レセプターが存在することが示唆される。横軸との交点より結合定数(K_a)が、縦軸との交点より最大結合力(B_{max})が得られた。高親和性レセプターの場合、 $K_a = 1.05 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $B_{max} = 5.25 \times 10^{-13} \text{ mol/mg}$ シナプトゾームタンパク質であり、一方低親和性レセプターの場合、 $K_a = 5.00 \times 10^8 M^{-1}$ 、 $B_{max} = 5.00 \times 10^{-12} \text{ mol/mg}$ シナプトゾームタンパク質であった。

^{125}I -毒素のシナプトゾーム内への侵入

あらかじめ265 ng の ^{125}I -毒素を 1 mg (タンパク質) のシナプトゾームと 0°C 、10分間結合させ、これを二つのグループに分けた。その一方を 0°C (●—●) で、他方は 37°C (○—○) でさらにインキュベートを続け、所定時間ごとに過剰量 (シナプトゾームタンパク質量 100 μg あたり 242 μg) の未標識毒素を添加し、 0°C 、10分間インキュベート後、シナプトゾームに残った ^{125}I -毒素量を測定した (図1-5)。 ^{125}I -毒素を 0°C でシナプトゾームに結合させた後、 37°C で再インキュベートすると、時間の経過とともに過剰量の未標識毒素で置換できない ^{125}I -毒素量が増加し、最終的に10分間で全結合 ^{125}I -毒素の 0.4% に相当するものがシナプトゾームから解離されなかった。 0°C での不解離 ^{125}I -毒素量は 37°C に比べると遙かに低かった。このことから、 ^{125}I -

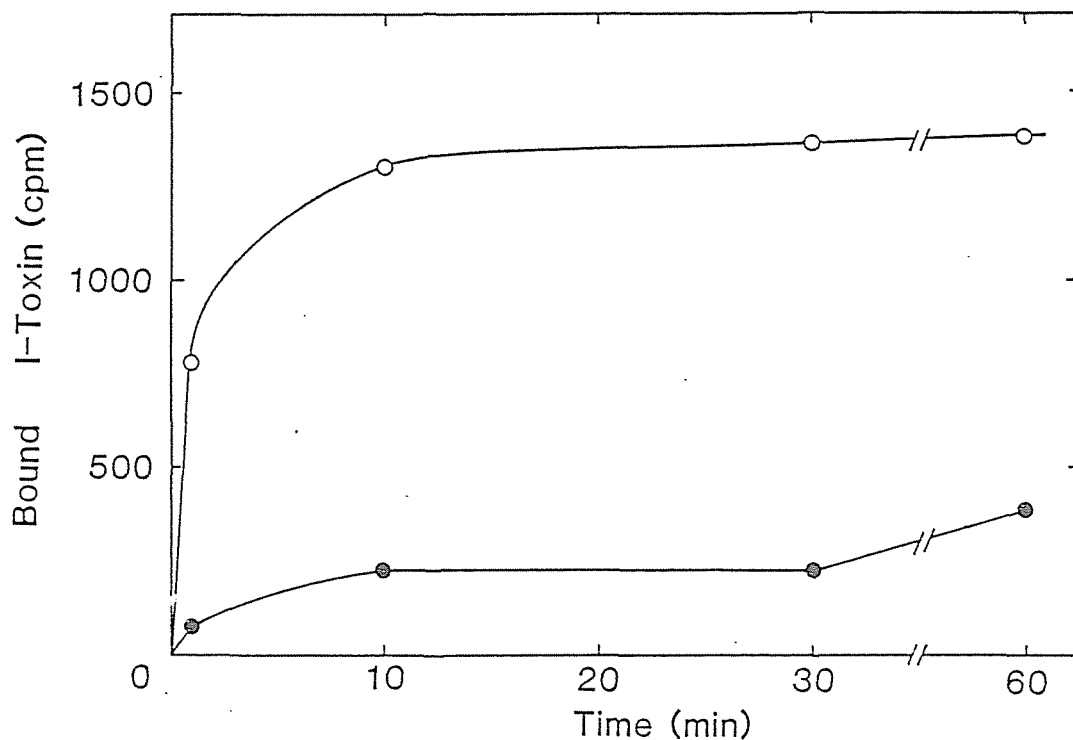


図 1-5 未標識毒素により置換されないシナプトゾームに結合した ^{125}I -毒素の増加

265 ng の ^{125}I -毒素をあらかじめ 1 mg タンパク質量のシナプトゾームと 10 ml の Inc. m. 中で 0°C 、10 分間インキュベートした。反応液を 2 つに分け、一方は 0°C (●—●) で、もう一方は 37°C (○—○) でインキュベートを続け、所定時間ごとに 1 ml を取り出し、それに過剰量 ($242\mu\text{g}$) の未標識毒素を加え 0°C 、10 分間インキュベートし、シナプトゾームに結合した ^{125}I -毒素を置換し、GF/C フィルターでろ過し、フィルター上に残った放射活性を測定した。すべての値は、 $242\mu\text{g}$ の未標識毒素存在下での 26.5 ng の ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合力 (非特異的結合力) を差し引いたものである。

毒素がシナプトゾーム膜へ結合した後、シナプトゾーム膜内、またはシナプトゾーム内へ温度に依存して侵入することが示唆される。

抗体による ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合の阻止

図1-6は ^{125}I -毒素とシナプトゾームとの結合を種々の量の抗毒素 ($\times$ — $\times$)、抗重鎖 ($\bullet$ — $\bullet$)、抗軽鎖 ($\circ$ — $\circ$) 抗体存在下で調べたものである。 ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は抗重鎖抗体によって最も強く阻止された。各抗体の50%阻止量(以下 ID_{50} と略す)は抗重鎖抗体で 780 ng 、抗毒素抗体で $7.1\text{ }\mu\text{g}$ 、抗軽鎖抗体で $60\text{ }\mu\text{g}$ であった。このことから、 ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は重鎖によることが示唆される。

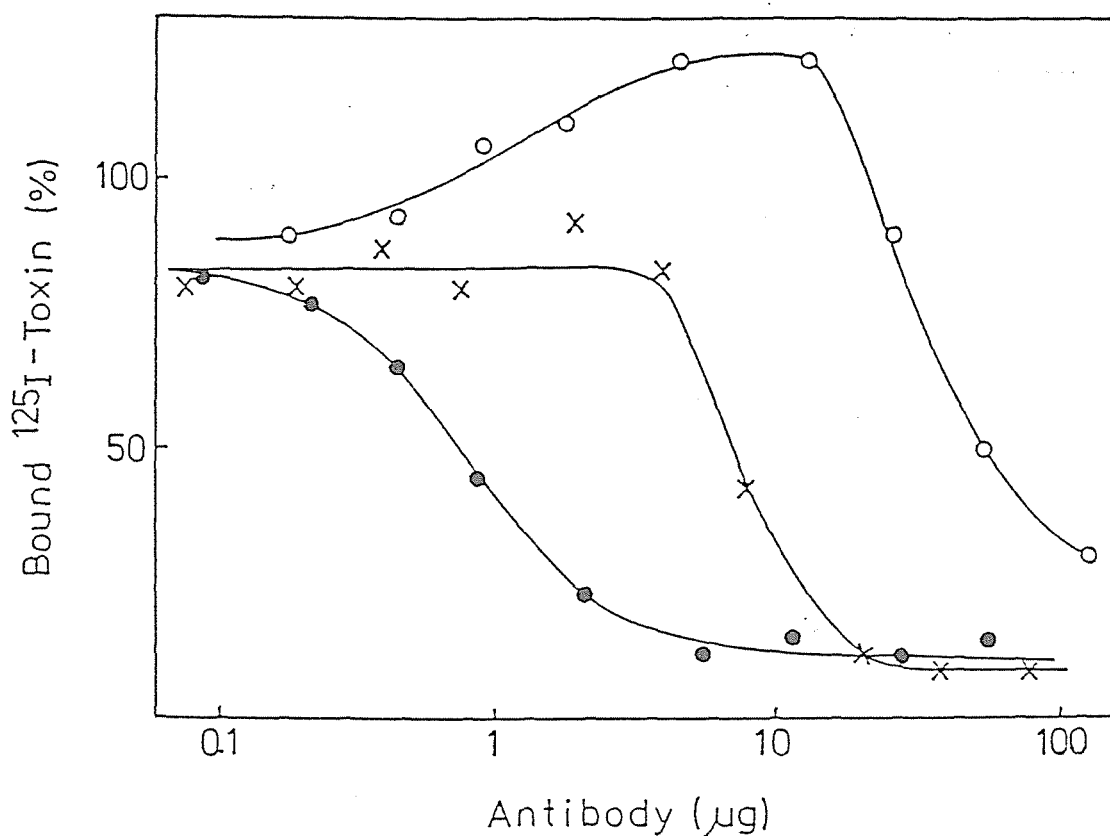


図1-6 抗毒素、抗重鎖、抗軽鎖抗体による ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合の阻止

26.5 ngの ^{125}I -毒素をあらかじめ900µlのInc. m. 中で抗毒素(x—x)、抗重鎖、(●—●)、抗軽鎖(○—○)抗体と0°C、20分間インキュベートし、次に100µlのシナプトゾーム(タンパク質量100µg)懸濁液を加え、さらに0°C、10分間インキュベートした。反応液をGF/cフィルターでろ過し、フィルター上に残った放射活性を測定した。

考 察

^{125}I -標識した C-ST 毒素のラット脳シナプトゾームへの結合様式について調べた。毒素の ^{125}I -標識は、チロシン残基が毒性発現に必須であるため、アミノ基に ^{125}I を導入する BOLTON と HUNTER⁽³⁾ の方法によった。 ^{125}I -毒素の比放射活性は $2\sim 5 \text{ Ci/g}$ 、毒性は元の毒素の $25\sim 35\%$ であった。また、 ^{125}I -毒素の重鎖と軽鎖への ^{125}I の標識分布は、重鎖に 36% 、軽鎖に 64% であった。しかし、かなりの毒性の減少にもかかわらず、シナプトゾームへの結合は高い結合定数を持ち、その値は未標識毒素のそれと大差はなかった(後述)。毒素のシナプトゾームへの結合は重鎖がになっている(後述)ので、両鎖の分子量(M.W.)を考慮に入れると(重鎖 M.W. $98,000$ 、軽鎖 M.W. $53,000$)重鎖への ^{125}I の標識は軽鎖の約 $1/6$ に相当し、このことが毒性の減少にもかかわらずシナプトゾームへの結合が保持された理由の一つと考えられる。

^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は温度(0°C と 37°C)に依存しなかった(図1-2)。予備実験において未標識の毒素とシナプトゾームを 0°C および 37°C で1時間インキュベートし、遠心($17,000 \times g$ 、30分間)分離後、上清の残存毒力から結合した毒素量を求めた場合、結合毒素量は 37°C の方が 0°C のそれより低い値を示した(図1-7)。これは、毒

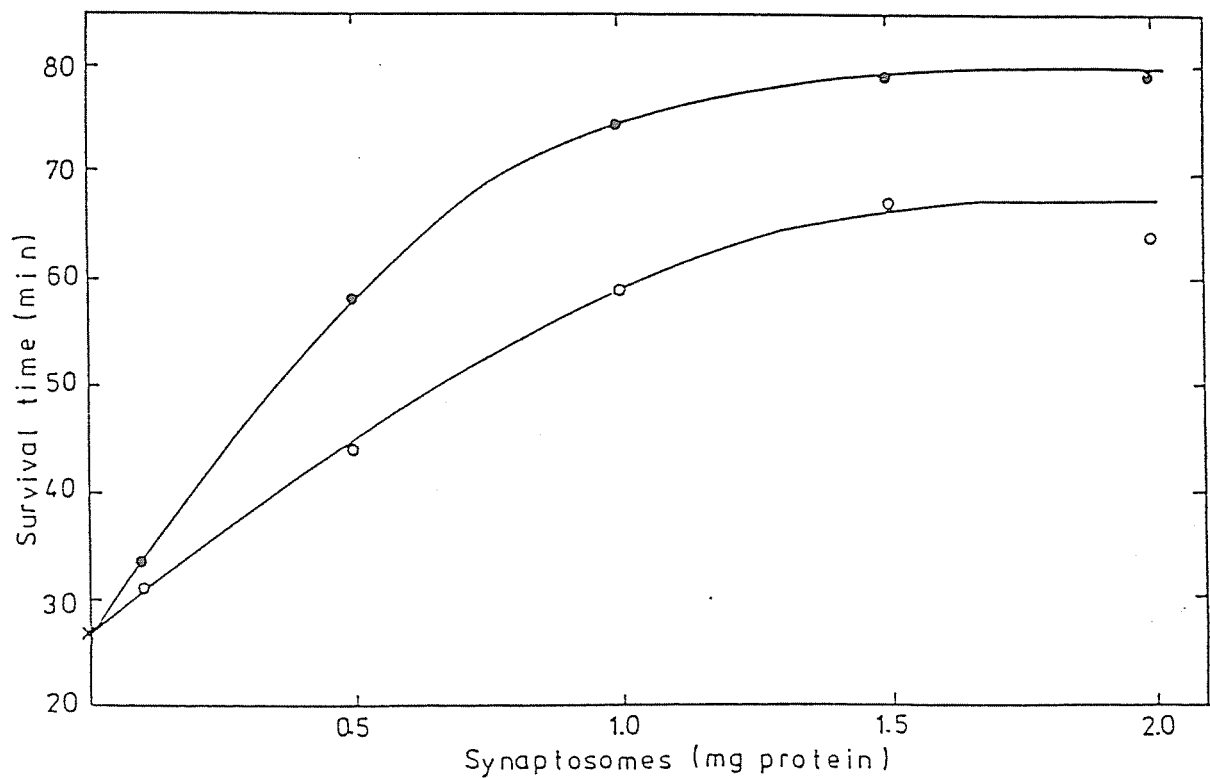


図1-7 未標識毒素のシナプトゾームへの結合

種々の濃度のシナプトゾームに対し、未標識毒素を 8.0×10^5 MLD/ml ($17 \mu\text{g}/\text{ml}$) 加え、 0°C (●—●) および 37°C (○—○) で1時間インキュベートし、遠心 ($17,000 \times g$, 30分間) 分離後、その上清をマウス ($n=3$) に注射し、生存時間を測定した。(X) はシナプトゾームを加えなかった時の毒素によるマウスの生存時間を示す。

素を脳ホモジネートのシトゾール画分と 37°C で1時間インキュベートした時に毒性が約3.5倍に上昇することから、毒素を 37°C でシナプトゾームとインキュベートした場合、シナプトゾームに結合しなかった毒素の毒性が上昇し、見かけ上シナプトゾームへ結合した毒素量が 0°C の時と比べて低くなることに起因すると考えられる。本実験では毒素を ^{125}I -標識し、シナプトゾームへの結合量を直接測定したので、結合に関する温度非依存性は正しいと考えられる。KITAMURA⁽¹⁷⁾らは ^{125}I -標識されたA型毒素のシナプトゾームへの結合が温度に依存していることを示した。これは毒素の型および精製度合の相違によるものと考えられる(氏らの使用した毒素にはまだヘムアグルチニン活性が残っていた)。またSIMPSON⁽³²⁾は横隔膜神経筋標本を用い、ボツリヌスA型毒素の神経筋接合部への結合の Q_{10} (温度が 10°C 変化した場合の変化量)はきわめて低いことを示した。このことから毒素のシナプトゾームへの結合は温度に依存しないことが推察される。

一定量のシナプトゾームに種々の濃度の ^{125}I -毒素をインキュベートし、結合および未結合の ^{125}I -毒素濃度を逆数プロットすると、異なる勾配をもつ二つの直線が得られた。このことから、シナプトゾーム膜上に2種類のボツリヌス毒素に対する

レセプターが存在することが示唆され、その結合定数(K_a)と最大結合量(B_{max})はそれぞれ、高親和性レセプターで $K_a = 1.05 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $B_{max} = 5.25 \times 10^{-13} \text{ mol/mg}$ シナプトゾームタンパク質、低親和性レセプターで $K_a = 5.00 \times 10^8 M^{-1}$ 、 $B_{max} = 5.00 \times 10^{-12} \text{ mol/mg}$ シナプトゾームタンパク質であった。未標識の毒素とシナプトゾームとを $0^\circ C$ でインキュベートし、遠心 ($17,000 \times g$ 、30 分間) 分離後の上清の毒力測定より得た逆数プロットからも 2 種類のレセプターの存在が示唆され、その結合定数は高親和性レセプターで $4.7 \times 10^{10} M^{-1}$ 、低親和性レセプターで $5.0 \times 10^8 M^{-1}$ であった。高親和性レセプターにおける ^{125}I -毒素と未標識毒素との K_a の相違は ^{125}I -標識による毒素の変性に起因すると考えられる。WILLIAMS⁽⁴⁵⁾らは ^{125}I -標識 A 型毒素とラット脳シナプトゾームとの結合様式を調べ 2 種類のレセプターの存在を示唆し、それらの結合定数は高親和性のもので $K_a = 1.7 \times 10^9 M^{-1}$ 、低親和性のもので $K_a < 4.0 \times 10^7 M^{-1}$ であり、高親和性の結合の B_{max} は $6.0 \times 10^{-14} \text{ mol/mg}$ シナプトゾームタンパク質であることを報告した。 K_a 値の違いは毒素の型の違い、あるいは ^{125}I -標識による重鎖の損傷の程度の違いと考えられる。また B_{max} の違いは使用したシナプトゾームの純度の違いと考えられる。

^{125}I -毒素を $0^\circ C$ であらかじめシナプトゾームに

結合した後、 37°C で10分間再びインキュベートすると全結合 ^{125}I -毒素の0.4%相当がもはや過剰量の未標識毒素で拮抗的に解離されなくなった(図1-5)。このことは結合した ^{125}I -毒素の一部がシナプトゾーム膜内あるいはシナプトゾーム内に侵入したことを示唆する。また、この侵入は温度に依存した。 ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合が温度に依存しないこと(図1-2)を考慮に入れると、これら一連の現象は、SIMPSON⁽³²⁾による、毒素のレセプターへの結合の Q_{10} は低く、細胞内への侵入の Q_{10} は高いという仮説と一致する。

抗毒素、抗重鎖および抗軽鎖抗体による ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は抗重鎖抗体により最も強く阻止された(図1-6)。このことから、毒素のシナプトゾームへの結合は重鎖がになっていることが示唆される。抗軽鎖抗体によっても抗重鎖抗体の約70倍の量で結合阻止が起こっているが、これは抗重鎖抗体の混在または過剰量の抗軽鎖抗体による立体阻害のためと考えられる。

第 2 章

ボツリヌス C 型毒素に対する
単クローン性抗体の作製および
抗体の性状

要 旨

C-ST毒素を免疫した BALB/c マウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞 P3X63-Ag8 とをポリエチレングリコール 1000 で融合し、融合細胞を作製した。限界希釈法により 2 回クローニングし、最終的に No. 9、12、14、および 17 の 4 種の単クローン性抗体を得た。酵素免疫測定法により C-ST、D-1873、D-SA 毒素との反応を調べた結果、No. 9、14、17 抗体は C-ST 毒素とだけ、No. 12 抗体は C-ST 毒素と D-SA 毒素の双方に反応した。またこれら 4 種の単クローン性抗体はいずれも C-ST 毒素の重鎖を認識した。さらに上記 3 種の毒素に対する中和能を調べた結果、No. 9 抗体と No. 14 抗体は C-ST および D-SA 毒素双方に対し中和能を示さなかったが、No. 17 抗体は C-ST 毒素に、No. 12 抗体は C-ST 毒素および D-SA 毒素双方に対して中和能を示した。以上の結果は C-ST 毒素と D-SA 毒素の間には共通抗原部位が重鎖上に存在し、その共通抗原部位あるいはその近傍は毒素の作用発現に必須な部位であることを示唆する。

序 文

ボツリヌス毒素の作用機構を研究する上で、抗毒素抗体は各種の目的に応じ利用されてきたが、毒素の作用機構を分子レベルで解明するためには、毒素の分子上の一つの抗原決定基を認識し、しかも1種類の抗体分子だけからなる方が好ましい。前章において C-ST 毒素のラット脳シナプトゾームへの結合の解析に抗毒素、抗重鎖抗体の有用性を示した。本章では毒素のレセプターへの結合の解析を目的とする単クローン性抗体の作製およびその性質について述べた。さらに、得られた単クローン性抗体の抗原認識の性質から、ボツリヌス C、D 型間の毒素の共通抗原性についても触れた。

材料および方法

ミエローマ細胞

BALB/c マウスミエローマ細胞、P3X63-Ag8 は北海道大学医学部富樫武弘博士より分与を受けた。

ミエローマ細胞は10%ウシ胎児血清 (Gibco, USA、以下 FCS と略す) および1.7% ストレプトマイシンを含む Dulbecco-modified Eagle 培地 (Gibco, USA、以下 DME-10 と略す) で継代培養した。

単クローン性抗体の作製

毒素に対する単クローン性抗体の作製は KÖHLER と MILSTEIN の方法を一部改良して行った。

1) 感作脾細胞

精製した C-ST 毒素 ($300\mu\text{g}/\text{ml}$) を0.4% ホルマリンを含む B-Nap に対して室温で1週間透析後、PBS で透析してホルマリンを取り除き、トキソイドを作製し、BALB/c マウスの腹腔内に2週間隔で $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ ずつ免疫した。2週間後 $100\mu\text{l}$ を静脈内注射しブースターを行い、3日後に脾臓を無菌的に取り出し感作脾細胞とした。

2) 融合細胞の作製

得られた感作脾細胞を0.83% NH_4Cl で4°C、10分間処理し、赤血球を溶血させ、FCS を含まない DME 培地 (以下 DME-0 と略す) で3回洗浄し、

10 ml の DME-O に脾細胞が 10^8 個になるように懸濁した。ミエローマ細胞も DME-O で 3 回洗浄し、10 ml の DME-O に 10^7 個になるように懸濁した。二つの懸濁液を混合し、軽く遠心 ($1000 \times g$, 5 分間) 分離して沈渣を得た。この沈渣を 50% ポリエチレングリコール 1000 (和光純薬) を含む DME-O

500 μ l 上に重層し軽く遠心した ($1000 \times g$, 5 分間)。その後 DME-O 25 ml をゆっくりと添加し、ポリエチレングリコールを希釈した。遠心 ($1000 \times g$, 5 分間) 分離後、20% FCS を含む DME 培地 (以下 DME-20 と略す) 25 ml を加え、細胞を浮遊させて一晩 37°C で培養した。細胞を遠心 ($1000 \times g$, 5 分間) 分離して集め、 1×10^{-4} M ヒポキサンチン、 4×10^{-7} M アミノプテリン、 1.6×10^{-5} M チミジン (以上 Sigma, USA) および 20% FCS を含む DME 培地 (以下 HAT-DME-20 と略す) 30 ml に浮遊させ、パスツールピペットで 3 滴ずつ (脾細胞 3.0×10^5 個) 96 穴のマイクロプレートに分注した。2 日間隔で HAT-DME-20 を加え、適宜古い HAT-DME-20 を吸引除去し、融合細胞のクローンが顕微鏡下で観察されるまで 10~20 日間 37°C で培養を行った。

3) スクリーニングとクローニング

融合細胞のクローンが増殖したマイクロプレート 96 穴の試料について後述する酵素免疫測定法 (固相法) (Enzyme linked immunosorbent assay 以下 ELISA

と略す) で抗体の有無をスクリーニングした。

抗体を産生しているクローンについては限界希釈法でクローニングを行った。融合細胞の浮遊液を HAT-DME-20 で希釈し、96 穴のマイクロプレートに 1 穴あたり 1 個の細胞が入るように分注し、以下同様に培養した。必要に応じて BALB/c マウスの胸腺細胞 5×10^6 個をフィーダー層として加えた。

4) 単クローン性抗体の大量作製

クローニングを行った融合細胞を遠心 ($1,000 \times g$, 5 分間) 分離して集め、1 週間前に 2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (和光純薬) $500 \mu\text{l}$ を腹腔内注射した BALB/c マウスに 10^7 個の融合細胞を腹腔内注射した。約 10 日後に増量した腹水および血清を採取した。

酵素免疫測定法 (ELISA)

BALB/c マウス血清から Protein A-セファローズ (Pharmacia, Sweden) カラムを用いマウス免疫グロブリン (以下 Ig と略す) G を精製した。マウス IgG (1 mg/ml) とフロイントのインコンプリートアジュバントとを等量混合し、家兎に 3 週間隔で上記混合液 2 ml を 2 回皮下に免疫し、さらに 3 週間後混合液 1 ml を静脈内注射し、5 日後全採血し血清を得た。マウス IgG 結合セファローズ 4B を用い、上記血清から抗マウス IgG (特異的ウサギ Ig) を精製した。このウサギ Ig と アルカリホスファタ

ーゼ (Sigma, USA) 800 U とを $500\mu\text{l}$ の PBS に溶解し、25% グルタルアルデヒド $4\mu\text{l}$ を加え、室温で 2 時間、 4°C で / 晩反応させた。反応物を 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) に対し透析後、50% グリセリン、1% BSA、1mM MgCl_2 を含む PBS で 10 倍に希釈し、 -20°C で保存した。

イムノプレート (Nunc, Denmark) にボツリヌス毒素、その重鎖あるいは軽鎖の B-Nap 溶液 ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) をそれぞれ $30\mu\text{l}$ (600ng) 加え、さらに 50mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) $60\mu\text{l}$ を添加して、 4°C で / 晩インキュベートし、プレートに毒素をコーティングした。ついで、0.5% BSA、0.05% Tween 20、0.02% NaN_3 を含む PBS (以下 ELISA 緩衝液と略す) $200\mu\text{l}$ で 3 回洗浄し、単クローン性抗体 $100\mu\text{l}$ を加え、 37°C で 2 時間インキュベートした。さらに、ELISA 緩衝液 $200\mu\text{l}$ で 3 回洗浄し、アルカリホスファターゼを標識した抗マウス IgG (特異的ウサギ Ig) $200\mu\text{l}$ を加え、 37°C で 2 時間インキュベートした。ELISA 緩衝液 $200\mu\text{l}$ で 3 回洗浄し、基質として 1mM MgCl_2 を含む 50mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.8) に溶解した 2.5mM パラニトロフェニルリン酸 $200\mu\text{l}$ を加え、 37°C で 30 分間インキュベートし、水で 10 倍に希釈し波長 420nm で、あるいはタイターテック・マルチスキャン (Flow Laboratories, USA) を用い、波長 405nm で遊離したパラニト

ロフェノールを測定した。必要に応じてアルカリホスファターゼで標識した単クローン性抗体を直接毒素と反応させ、その酵素活性を測る方法も使用した。

単クローン性抗体の精製

ボツリヌス毒素に対し陽性反応の単クローン性抗体を含む腹水あるいは血清を、ボツリヌス毒素を結合させたセファローズ4Bカラム(1×4cm)に通しPBSで十分洗浄後、3M KSCNでボツリヌス毒素に特異的なIgGを溶出し、PBSで十分透析し、精製単クローン性抗体とした。

ゲル等電点分離法

ゲル等電点分離法(以下IFと略す)はRIGHETTI⁽²⁹⁾とDRYSDALEの方法を一部改良して行った。単クローン性抗体50μgを5%ポリアクリルアミド混合液(アクリルアミド:ビスアクリルアミド 20:1)、2% Ampholine、pH 3.5~10(LKB, Sweden)、0.0005% リボフラビン、0.01% 過硫酸アンモニウムおよび水と混合して溶解し、0.5×10cmのガラスカラム中で、紫外線をあててゲル化させた。電極液は陰極に20mM H₃PO₄、陽極に1M NaOHを用い、4℃で200V、12時間電気泳動を行った(最初の1時間は100V、最後の1時間は300Vで通電した)。ゲルの染色、脱色はREISNER⁽²⁸⁾らの方法によった。すなわち3.5% 過塩素酸に溶解した0.03% クーマシーブリ

リアントブルー G-250 で 40°C 、1 時間ゲルを染色後、10 % 酢酸で脱色した。

単クローン性抗体の免疫学的性状

単クローン性抗体のサブクラスおよび軽鎖の種類を決定するために、マウスの IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM および軽鎖の入型、 κ 型に対する特異抗血清 (Miles Laboratories, USA) と腹水とをゲル内沈降反応させた。

中和試験

単クローン性抗体のボツリヌス毒素に対する中和能の測定は毒素と抗体との混液を dd 系マウスの腹腔内あるいは静脈内に注射する 法によった。すなわち前者では 10 MLD/ml の毒素 B-Nap 溶液と PBS で階段希釈した同量の抗体溶液とを 37°C 、2 時間反応させ、この混液 500 μl を腹腔内注射し、マウスの生死を判定した。一方、後者では 8×10^4 または 2×10^4 MLD/ml の毒素 B-Nap 溶液と PBS で階段希釈した同量の抗体溶液とを、 37°C 、2 時間反応させ、この混液 100 μl を静脈内注射し、マウスの生存時間を計り、図 1-1 より中和されなかった毒素量を求め、中和能の指標とした。

結 果

単クローン性抗体の作製

感作脾細胞とミエローマ細胞、P3X63-Ag 8 との細胞融合の割合は 5~40% で、そのうちの 5% がボツリヌス毒素に対する抗体を産生した。フィーダー層を加えなかった系では、活性の低いいくつかの融合細胞は培養系の拡大の際に増殖を停止した。最終的に No. 9, 12, 14, および 17 の 4 種の融合細胞が確立した。

単クローン性抗体の性状

1) 免疫学的性状

マウスの IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM および軽鎖の κ 型、 λ 型 に対する特異抗血清と培養上清とのゲル内沈降反応の結果、得られた 4 種の単クローン性抗体はすべて IgG1 で軽鎖は κ 型であった。

2) ゲル等電点分離法 (IEF)

単クローン性抗体を含む腹水から、C-ST 毒素を結合したセファローズ 4B を使用し精製した特異的抗 C-ST 抗体について IEF を行った。図 2-1 はその泳動パターンを示したものである。マウスの腹水だけを C-ST 毒素結合セファローズ 4B に通すと、腹水中にセファローズあるいは C-ST 毒素と結合するタンパク質が存在するため、pH 4.5~5.0 の範囲に複数のバンドがみられた (レーン C)。したがって、すべての単クローン性抗体の泳動パターン



図 2-1 単クローン性抗体の IEF

C-ST 毒素を結合したセファローズ 4B を使用し、腹水から精製した単クローン性抗体 No. 9、12、14、および 17 を水に対して透析し、それぞれ $50 \mu\text{g}$ を 5% アクリルアミド混合液 (アクリルアミド: ビスアクリルアミド 20:1)、2% Ampholine (pH 3.5~10)、0.0005% リボフラビン、0.01% 過硫酸アンモニウムおよび水と混合して溶解し、ガラスカラム ($0.5 \times 1 \text{ cm}$) 中でゲル化させた。200V、12時間の電気泳動後、0.03% クーマシーブリリアントブルー G-250 (3.5% 過塩素酸) で染色した。C は融合細胞を接種していないマウスの腹水を同様に C-ST 毒素結合セファローズ 4B で精製したものである。

の pH 4.5 ~ 5.0 の範囲に見られる複数のバンドはこれらに対応するものであり、抗体ではないと考えられる。

No. 9 は pH 7.3 付近に 2 本、pH 7.7 付近に 2 本、No. 12 は pH 6.0 付近に 2 本、pH 6.6 付近に薄く 2 本、No. 14 は pH 6.8 付近に濃く 3 本、薄く 1 本、No. 17 は pH 6.2 付近に 2 本、pH 6.7 付近に濃く 2 本、薄く 1 本のバンドが検出された。これらの泳動パターンは、それぞれの抗体を産生するクローンを再度限界希釈法によりクローニングしたサブクローンから得られる抗体の場合でも同一であった。したがって、確立された 4 種の融合細胞は単クローンであることが証明された。

3) 認識抗原

上記 C-ST 毒素に対して作製した 4 種の単クローン性抗体と精製 C-ST、D-SA および D-1873 毒素との反応を ELISA により確かめた(表 2-1)。

No. 9、14、17 抗体は C-ST 毒素だけと反応し、他の 2 つの D 型毒素とは反応しなかった。しかし、No. 12 抗体は C-ST 毒素と D-SA 毒素双方に同程度反応した。

C-ST 毒素を重鎖と軽鎖に分離し、それらを抗原として ELISA を行った(表 2-2)。その結果すべての単クローン性抗体は重鎖とだけ反応した。

以上の結果から C-ST 毒素と D-SA 毒素間には共通

表 2-1 単クローン性抗体と毒素による ELISA^a

Dilution of ascites fluids	Absorbancy of p-nitrophenol											
	No. 9			No. 12			No. 14			No. 17		
	C-ST	D-SA	D-1873	C-ST	D-SA	D-1873	C-ST	D-SA	D-1873	C-ST	D-SA	D-1873
10 ⁻¹	0.52	0.03	0.03	0.54	0.50	0.04	0.48	0.03	0.02	0.50	0.04	0.02
10 ⁻²	0.68	- ^b	-	0.66	0.61	-	0.63	-	-	0.71	-	-
10 ⁻³	0.58	-	-	0.62	0.58	-	0.60	-	-	0.66	-	-
10 ⁻⁴	0.23	-	-	0.21	0.18	-	0.29	-	-	0.25	-	-
10 ⁻⁵	0.11	-	-	0.08	0.07	-	0.10	-	-	0.12	-	-

a 600 ng の各毒素をコーティングした ELISA プレート中で、10 倍階段希釈した腹水およびアルカリホスファターゼ標識した抗マウス IgG（特異的ウサギ Ig）を順次反応させ、基質としてパラニトロフェニルリン酸を添加し、遊離したパラニトロフェニールを波長 420 nm で測定し、その吸光度を示した。

b 0.01 以下

表 2-2 単クローン性抗体とC-ST毒素重鎖および
軽鎖による ELISA^a

Dilution of ascites fluids		Absorbancy of p-nitrophenol	
		Hc	Lc
No. 9	10 ⁻¹	0.33	0.04
	10 ⁻²	0.25	- ^b
	10 ⁻³	0.18	-
No. 12	10 ⁻¹	0.41	0.06
	10 ⁻²	0.38	-
	10 ⁻³	0.35	-
No. 14	10 ⁻¹	0.39	0.05
	10 ⁻²	0.28	-
	10 ⁻³	0.22	-
No. 17	10 ⁻¹	0.33	-
	10 ⁻²	0.28	-
	10 ⁻³	0.22	-
Anti-C-ST ^c	10 ⁻¹	0.47	0.29
	10 ⁻²	0.27	0.15
	10 ⁻³	0.22	0.04

a 600 ng の重鎖または軽鎖をコーティングした
ELISAプレート中で表 2-1 と同様操作した。

b 0.01 以下

c マウス抗C-ST 毒素血清

抗原部位が重鎖上に存在し、No. 12 抗体はこの共通抗原部位を認識していることがわかった。

4) 中和試験

中和試験は単クローン性抗体と毒素との混合液を腹腔内あるいは静脈内に注射する二法から調べた。表 2-3 は腹腔内注射の結果であり、10 MLD/ml の濃度の各毒素に対する単クローン性抗体の中和能を示した。実験 I においては腹水をそのまま使用し、10 MLD/ml の毒素を完全に中和する最高希釈倍数を示した。No. 9、14 抗体はどの毒素に対してもほとんど中和能を示さなかった。一方、No. 17 抗体は C-ST 毒素だけを中和した。しかし、No. 12 抗体は C-ST 毒素と D-SA 毒素双方を同程度中和した。No. 12 抗体と No. 17 抗体との C-ST 毒素に対する中和能の差を正確に求めるために、両抗体を C-ST 毒素結合セファローズ 4B で精製し、濃度を $130 \mu\text{g/ml}$ として中和試験を行った（実験 II）。その結果同じ濃度の溶液では No. 17 抗体の方が No. 12 抗体よりもわずかに中和能が高いことがわかった。

表 2-4 は静脈内注射の結果であり、No. 12 および 17 両抗体の腹水（実験 I）および精製 IgG（実験 II）の C-ST 毒素に対する中和能を 8×10^4 MLD/ml および 2×10^4 MLD/ml を用いて、dd 系マウスの生存時間の延長効果より求めたものである。表 2-3 と同様に腹水では両抗体とも同程度の中和能を示し、

表 2-3 単クローン性抗体による毒素の中和試験^a

Antibody	Toxin		
	C-ST	D-SA	D-1873
— Expt. I —			
Anti-C-ST	1600	80	16
Anti-D-SA	160	6400	1600
No. 9	8	<4	<4
No. 12	400	400	<4
No. 14	4	<4	<4
No. 17	1600	<4	<4
— Expt. II —			
Anti-C-ST	160		
No. 12	20		
No. 17	40		

a 10 MLD /ml の毒素溶液と PBS で階段希釈した腹水（実験 I）または精製単クローン性抗体（実験 II）を等量混合し、マウス腹腔内に注射し、マウスの生死を観察した。表中の値は毒素を完全に中和した腹水の希釈倍数である。

表 2-4 単クローン性抗体 No. 12 および No. 17 による毒素の中和試験^a

Dilution of antibody	No. 12			No. 17		
	Survival time (min)	Remaining toxin (LD ₅₀ /ml)	Neutralized toxin (%)	Survival time (min)	Remaining toxin (LD ₅₀ /ml)	Neutralized toxin (%)
— Expt. I —						
100 X	112	3.0×10^3	93	310	1.5×10^2	> 99
200	98	4.0×10^3	90	256	2.4×10^2	> 99
400	85	7.0×10^3	83	78	9.0×10^3	77
800	75	1.1×10^4	73	70	1.5×10^4	64
control ^b	55	4.0×10^4				
— Expt. II —						
60 μ g	145	2.0×10^3	80	270	2.2×10^2	98
30	120	2.4×10^3	76	240	3.2×10^2	97
15	106	3.3×10^3	67	86	6.5×10^3	35
7.5	87	6.5×10^3	35	60	8.5×10^3	15
control ^b	77	1.0×10^4				

a PBS で階段希釈した腹水（実験 I）または精製単クローン性抗体と一定量の毒素溶液を等量混合し、マウス尾静脈より注射し、生存時間から残存毒力を求め、中和された毒素のパーセントを算出した。

b 毒素だけの毒力値

精製 IgG では No. 17 抗体の方が若干中和能が強かった。

考 察

KÖHLER と MILSTEIN⁽¹⁹⁾ により、初めてヒツジ赤血球に対する単クローン性抗体が作製されて以来、種々の抗原に対する単クローン性抗体が作られた。本研究では C-ST 毒素を抗原とした単クローン性抗体の作製を試み、4種類の単クローン性抗体を作製した。

4種類の抗体はすべて C-ST 毒素の重鎖を認識した。最近、OGUMA⁽²⁶⁾ らは C-ST、D-1873、D-SA 毒素に対するそれぞれの単クローン性抗体 24 種を新たに作製したが、重鎖を認識したものは 14 種、軽鎖を認識したものはわずか 5 種、他は不明であった。さらに SAKAGUCHI らも B 型毒素に対する単クローン性抗体 5 種を作製したが、これらはいずれも重鎖を認識した（私信）。以上の結果から重鎖の抗原性が軽鎖のそれより強いことが推察される。しかし SYUTO と KUBO⁽⁴⁰⁾ により抗軽鎖抗体だけでも、抗毒素、抗重鎖抗体同様に中和能があることが示された。一方、重鎖、軽鎖だけでは全く毒性がないことから、重鎖と軽鎖はそれぞれ独立に毒作用発現の役割を分担していると思われる。

今回得られた 4 種の単クローン性抗体のうち 2 種は中和能をもたず、2 種が中和能を有した。このことから、ボツリヌス毒素の分子上には複数の抗原決定部位が存在し、ある抗原決定部位は毒作

用と全く関係なく、またある抗原決定部位は毒作用の活性部位あるいはその付近に存在し、中和能に深く関連すると推察される。

ボツリヌスC型菌の産生する毒素は抗C型毒素血清だけでなく抗D型毒素血清でも中和され、また、D型菌の産生する毒素は抗D型毒素血清だけでなく、抗C型毒素血清によっても中和されることから、JANSEN⁽¹⁵⁾はC型菌もD型菌もそれぞれC、D型両毒素を産生すると報告した。しかし OGUMA⁽²⁴⁾らは精製 C-ST, D-SA 両毒素を用い、ゲル内沈降反応法により、両毒素の重鎖に共通抗原部位の存在することを示唆し、さらに、著者らは⁽²⁵⁾C-ST, D-1873 毒素間にも共通抗原部位の存在することを示唆した。今回得られた単クローン性抗体 No. 12 は C-ST, D-SA 両毒素に反応し、この仮説を強く支持した。またこの共通抗原部位は重鎖上に位置し、No. 12 抗体が両毒素に対し中和能をもつことから、この共通抗原部位は毒素の活性に重要な部分、あるいはその近傍に存在すると考えられる。一方、前述した OGUMA らの新たに作製した24種の単クローン性抗体のうち、3種が C-ST および D-SA 毒素と反応した。さらに、6種が C-ST, D-SA および D-1873 毒素と反応し、うち3種は重鎖を、残り3種は軽鎖を認識した。このことから3種の毒素間ではいくつかの共通抗原部位が重鎖、軽鎖ともに存在するこ

とが明らかである。なお得られた4種の単クローン性抗体によるC-ST毒素のレセプターへの結合阻止については第三章で述べた。

第 3 章

ボツリヌスC型毒素分子上の
ラット脳シナプトゾームおよ
び"ガングリオシド GT1b 結合
部位と単クローン性抗体に対
する抗原決定部位との関係

要 旨

C-ST毒素に対する4種の単クローン性抗体を使用し、 ^{125}I -毒素のラット脳シナプトゾームおよびガングリオシド GT1b への結合の阻止について調べ、毒素分子上での両者の結合部位と単クローン性抗体に対する抗原決定部位との関係について考察した。

4種の単クローン性抗体のうち、C-ST毒素に対して中和能を有する No. 12 抗体は ^{125}I -毒素とシナプトゾームとの結合を強く阻止した。また、中和能のない No. 9 および No. 14 抗体は ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合を部分的に阻止した。しかし、C-ST 毒素に対して中和能を有する No. 17 抗体は ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合を阻止しなかった。

^{125}I -毒素と GT1b との結合は No. 9 抗体だけにより阻止され、他の3種の抗体では阻止がみられなかった。また、毒素と No. 9 抗体との結合は GT1b により阻害を受けたが、毒素と No. 12 抗体との結合は GT1b により阻害を受けなかった。以上の結果から、シナプトゾーム膜上には毒素の毒性発現に関し、GT1b 以外の真のレセプターの存在が示唆され、No. 12 抗体はこのレセプターに対する毒素の結合部位あるいはその近傍を認識し、No. 9 抗体は GT1b に対する毒素の結合部位あるいはその近傍

を認識していることが示唆される。なお両単クローン性抗体は重鎖を認識しているので、シナプトゾーム膜上のレセプターおよび GT1b に対する毒素分子上の結合部位は重鎖に存在すると考えられる。

アルカリホスファターゼ標識 - No. 12 抗体と毒素との結合は未標識の No. 12 抗体により阻止された。しかし、アルカリホスファターゼ標識 - No. 9 抗体と毒素との結合は未標識の No. 9 および No. 12 の両抗体により阻止された。したがって No. 9 抗体と No. 12 抗体に対する抗原決定部位は重鎖分子上で一部重複し、その重複した部分は No. 9 抗体との反応にとって必須の部位であると考えられる。

序 文

第一章および第二章ではボツリヌス毒素のラット脳シナプトゾームへの結合は2種類の結合定数をもつきわめて速い反応であることを明らかにし、この反応には毒素分子の重鎖が関与することを示した。一方シナプトゾーム上の毒素レセプターに関して以下の諸説がある。すなわち SIMPSON と RAPPORT⁽³⁵⁾ はシナプトゾーム膜上に豊富に存在するガングリオシド GT1b と毒素とをインキュベートしマウスに注射すると、延命効果を示すことを報告し、GT1b は毒素のレセプターであるとした。さらに、KITAMURA⁽¹⁷⁾ は種々のガングリオシドと毒素との結合を調べ、GT1b が毒素に対する延命効果が一番高いことを示した。一方、WONNACOTT⁽⁴⁶⁾ は、ボツリヌス毒素によるシナプトゾームからの Ach の放出阻害がガングリオシドによって阻止されないことを示し、また、KITAMURA⁽¹⁶⁾ は、シナプトゾームに結合した¹²⁵I-毒素がノイラミニダーゼ処理だけでなく、トリプシン処理によっても遊離されてくることから、毒素のシナプトゾーム上のレセプターがシアル酸を含む糖タンパク質である可能性を示唆した。

上述したように、現在ボツリヌス毒素のレセプターについては GT1b であるとする説と、それを否定するものがあり、明確にされていない。した

がって本章では、C-ST毒素に対する4種の単クローン性抗体を用い、 ^{125}I -標識C-ST毒素のラット脳シナプトゾームおよびG_{T1b}への結合の阻止を調べ、毒素分子上におけるレセプターの結合部位と単クローン性抗体に対する抗原決定部位との関係を考察した。

材料および方法

ガングリオシド

ガングリオシド GM3 は北海道大学獣医学部内貴正治博士より分与を受けた。

ガングリオシド GT1b は Seromed (West Germany) および Biosynth AG (Switzerland) より購入した。

これらのガングリオシドは薄層クロマトグラフィーで一つのバンドを示し、均一な標品であった。

シヨ糖密度勾配遠心

^{125}I -毒素、 ^{125}I -毒素と単クローン性抗体結合物および ^{125}I -毒素と GT1b 結合物のシヨ糖密度勾配遠心は KITAMURA⁽¹⁷⁾らの方法に準じて行った。すなわち、5% および 15% シヨ糖-PBS 溶液から 4.5 ml の密度勾配溶液を遠心管中に作製し、試料を重層し、日立 RPS-65 トローターで 50,000 rpm、5 時間遠心した。遠心管の底より 150 μl ずつ分画し、LKB-ミニガンマ γ 線測定器で放射活性を計測した。沈降定数は MARTIN と AMES⁽²²⁾の方法で求めた。

単クローン性抗体

第二章で述べた No. 9、12、14 および 17 の 4 種類の抗体を使用した。

結 果

単クローン性抗体による ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合の阻止

図3-1は4種類の単クローン性抗体による ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合の阻止を調べたものである。No. 12抗体 ($\Delta-\Delta$) が最も強く阻止し、 ID_{50} は26 ngであり、この量は ^{125}I -毒素とほぼ1:1のモル比であった。一方、No. 17抗体 ($\bullet-\bullet$) はC-ST毒素に対しNo. 12抗体よりも強い中和能をもつ(表2-3および2-4)にもかかわらず、 ^{125}I -C-ST毒素のシナプトゾームへの結合はほとんど阻止しなかった。また、No. 9抗体 ($\circ-\circ$) およびNo. 14抗体 ($\odot-\odot$) は ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合を弱く阻止した。

単クローン性抗体による ^{125}I -毒素とガングリオシド GT_{1b} との結合の阻止

図3-2は ^{125}I -毒素 ($\bullet-\bullet$)、 ^{125}I -毒素と単クローン性抗体No. 12 ($\times-\times$) および ^{125}I -毒素と GT_{1b} ($\circ-\circ$) をそれぞれ 500 μl の 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) 中で 37°C 、20分間インキュベート後、ショ糖密度勾配液上に重層し、日立 RPS 65T ローターで 50,000 rpm、5時間遠心し、底から 150 μl ずつ分画し、その放射活性を測ったものである。 ^{125}I -毒素だけでは 7S の位置に沈降するが、過剰量の単クローン性抗体とインキュベートすると、

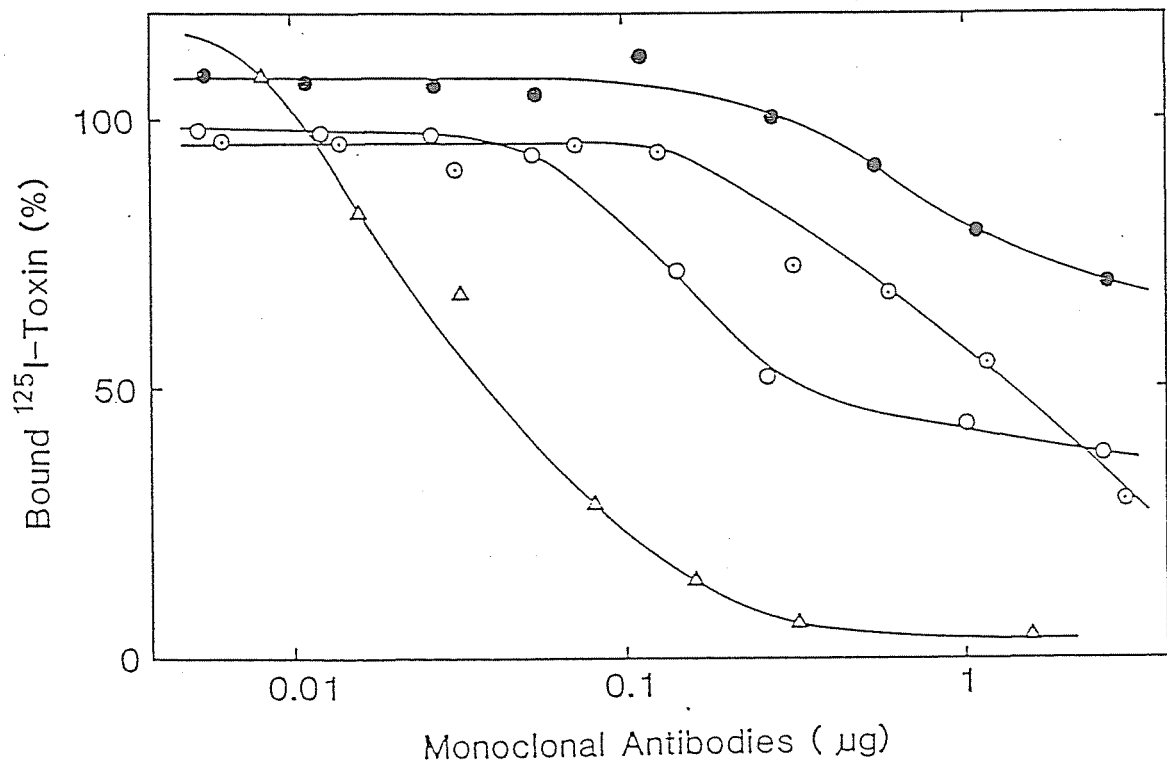


図 3-1 単クローン性抗体による ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合の阻止

26.5 ng の ^{125}I -毒素をあらかじめ 900 μl の Inc. m. 中で単クローン性抗体 No. 9 (○—○)、No. 12 (△—△)、No. 14 (⊙—⊙)、No. 17 (●—●) と 37°C、20 分間インキュベートし、次に 100 μl のシナプトゾーム (タンパク質量 100 μg) 懸濁液を加え、さらに 0°C、10 分間インキュベートした。反応液を GF/c フィルターでろ過し、フィルター上に残った放射活性を測定した。

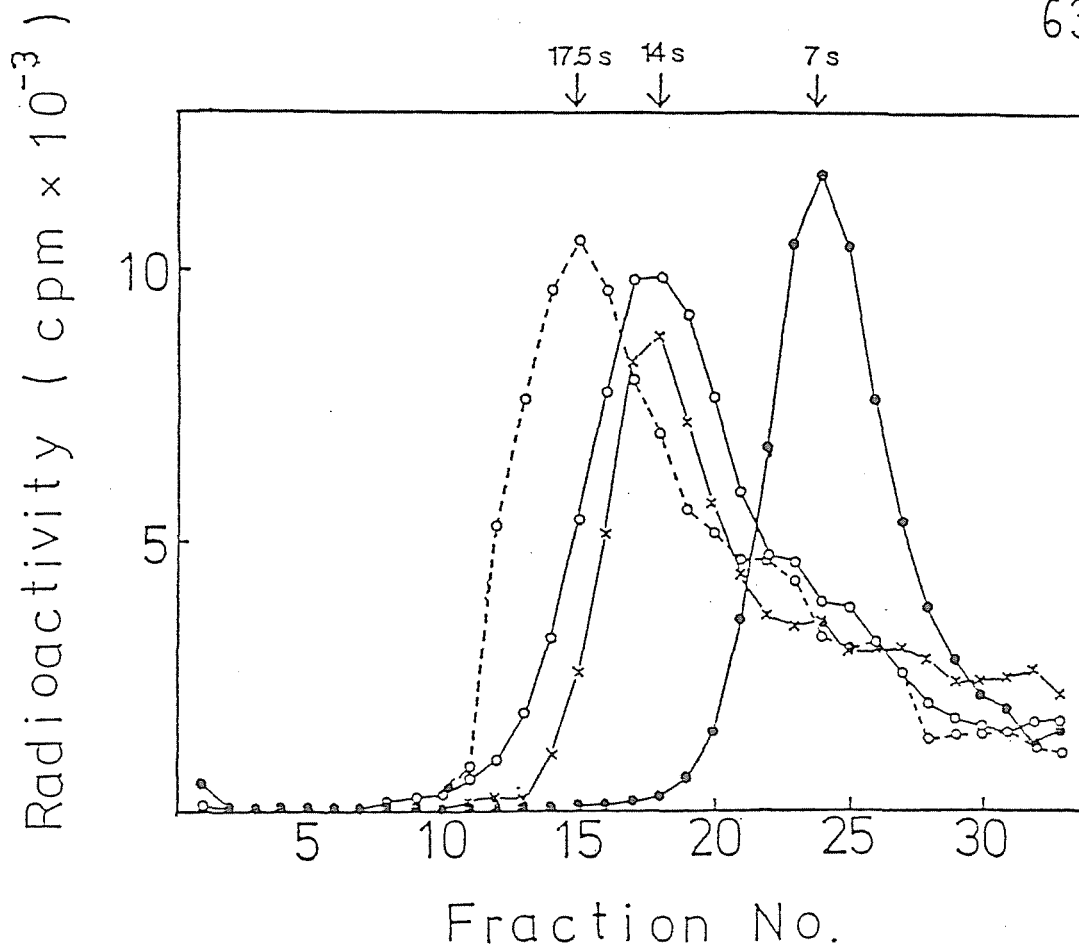


図 3-2 ^{125}I -毒素と単クローン性抗体および GT1b
との結合

20 ng の ^{125}I -毒素と 1 μg の単クローン性抗体 No. 12
(x—x)、

20 ng の ^{125}I -毒素と 4 μg の GT1b (○—○)、

をそれぞれ 500 μl の 10 mM トリス-塩酸緩衝液
(pH 7.2) 中で 37°C、20 分間インキュベートし、4.5 m
の 5~15% ショ糖-PBS 密度勾配液上に重層し、
日立 RPS-65T ローターで 50,000 rpm、5 分間遠心
した。底から 150 μl ずつ分画し、その放射活性を計
測した。●—● は ^{125}I -毒素だけを同様操作したもの、
○—○ は同量の ^{125}I -毒素と GT1b とを 500 μl の Inc. m.
中で同様にインキュベート後、遠心したものである。

その沈降定数は14sに移った。また、 ^{125}I -毒素とGT1bとをインキュベートした場合も両者は結合して沈降定数は14sに移った。Kozaki⁽¹⁸⁾らは、毒素とGT1bとの結合は高イオン強度である生理的条件下では起こらないとしている。しかし、 ^{125}I -毒素とGT1bを生理的イオン強度のInc. m. 中でインキュベートした場合(○--○) その沈降定数は17.5sに移り、明らかに両者の結合がみられた。したがって、以後の結合条件はすべて10mM トリス緩衝液中で行った。

次に ^{125}I -毒素をあらかじめ十分量の単クローン性抗体とインキュベート後、さらにGT1bを加えてその結合を調べた。図3-3(A)はNo. 12抗体、図3-3(B)はNo. 9抗体を使用した結果を示した。図3-3(A)から明らかのように、 ^{125}I -毒素はNo. 12抗体と複合物を形成した後もGT1bと結合し、その沈降定数は18.5sに移った(○—○)。対照として用いたGM3は ^{125}I -毒素とも(x--x)、 ^{125}I -毒素とNo. 12抗体との複合物とも(○--○)結合しなかった。No. 14およびNo. 17抗体についても同様の実験を行ったが、結果はこれと同じであり、毒素と抗体との複合物にGT1bがさらに結合した。一方、No. 9抗体が ^{125}I -毒素に結合すると、もはやその複合物にはGT1bは結合できなかった(図3-3(B)、○—○)。このことはNo. 9抗体が毒素のGT1bへの結合部位、あ

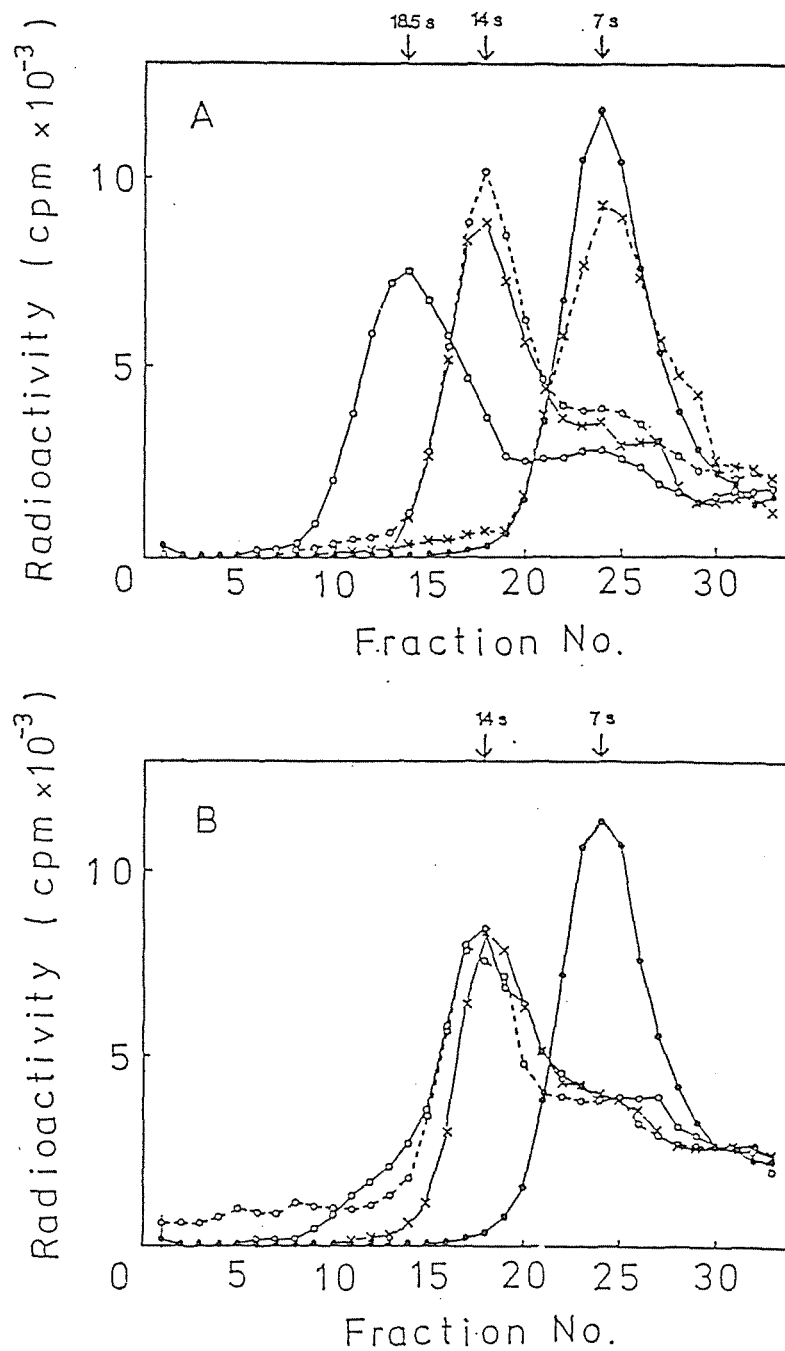


図 3-3 単クローン性抗体による ^{125}I -毒素と GT1b
との結合の阻止

(図の説明は 66 ページに示した)

(図3-3の説明)

20 ng の ^{125}I -毒素と 1 μg の単クローン性抗体とを 500 μl の 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) 中で 37°C、20 分間インキュベートし、以後図3-2と同様にショ糖密度勾配遠心を行い、各画分について放射活性を計測した (x—x)。同量の ^{125}I -毒素と単クローン性抗体をあらかじめ 37°C、20 分間インキュベート後、4 μg の GT1b を加えてさらに 37°C、20 分間インキュベートし、以後図3-2と同様にショ糖密度勾配遠心を行い、各画分について放射活性を計測した (○—○)。x--x は 20 ng の ^{125}I -毒素と 4 μg の GM₃ を 37°C、20 分間インキュベートしたもの、○--○ は 20 ng の ^{125}I -毒素と 1 μg の単クローン性抗体をあらかじめ 37°C、20 分間インキュベートしたものに 4 μg の GM₃ を加えさらに 37°C、20 分間インキュベートしたものを同様操作したものである。●—● は ^{125}I -毒素だけを同様操作した。A 図では No. 12 抗体、B 図では No. 9 抗体を使用した。

るいはその近傍を認識していることを示唆する。

図3-4はGT1bによる毒素と単クローン性抗体No. 9およびNo. 12との結合の阻止をELISAにより調べたものである。No. 9抗体(○—○)と毒素との結合はGT1bによって阻止されたが、No. 12抗体(△—△)と毒素との結合はGT1bによって阻止されず、No. 9抗体が毒素のGT1bとの結合部位あるいはその近傍を認識していることが再確認された。

単クローン性抗体に対する抗原決定部位

^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合を阻止するNo. 12抗体と、 ^{125}I -毒素とGT1bとの結合を阻止するNo. 9抗体に対する抗原決定部位について調べた。

図3-5(A)はアルカリホスファターゼで標識したNo. 9抗体と毒素との結合の阻止を未標識のNo. 9抗体(○—○)および他の3種の抗体No. 12(△—△)、No. 14(◎—◎)、No. 17(●—●)を用いて調べたものである。非特異的な結合阻止が約50%みられ、また、90~100%結合阻止を明確にするために、縦軸はパーセントを対数で表示した。

アルカリホスファターゼ標識-No. 9抗体と毒素との結合は未標識No. 14、No. 17抗体では阻止されなかったが、No. 9抗体では100%、No. 12抗体では93%阻止された。図3-5(B)はアルカリホス

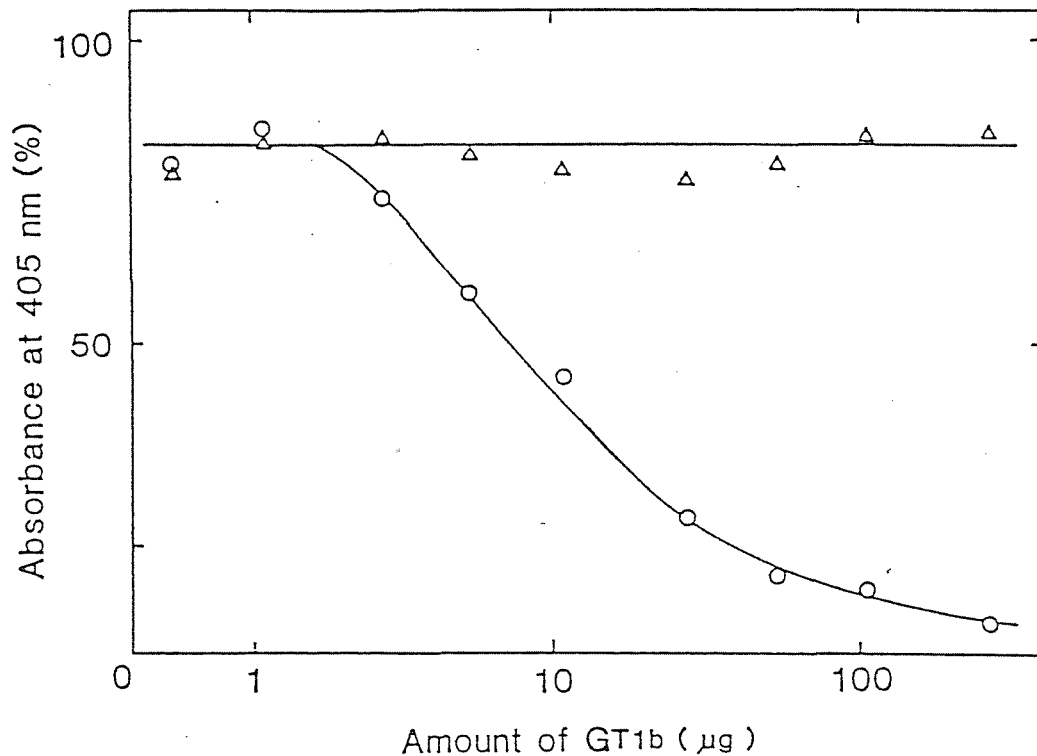


図 3-4 GT1b による単クローン性抗体と毒素との結合の阻止

600 ng の C-ST 毒素をコーティングした ELISA プレートに種々の濃度の GT1b 存在下で、アルカリホスファターゼ標識した単クローン性抗体 No. 9 (○—○) と No. 12 (△—△) を加え、37°C、2 時間インキュベートした。インキュベート後 ELISA 緩衝液で 3 回洗浄し、基質として 2.5 mM パラニトロフェニルリン酸 200 μl を加え、37°C で 30 分間インキュベート後、遊離したパラニトロフェノールを波長 405 nm で測定した。

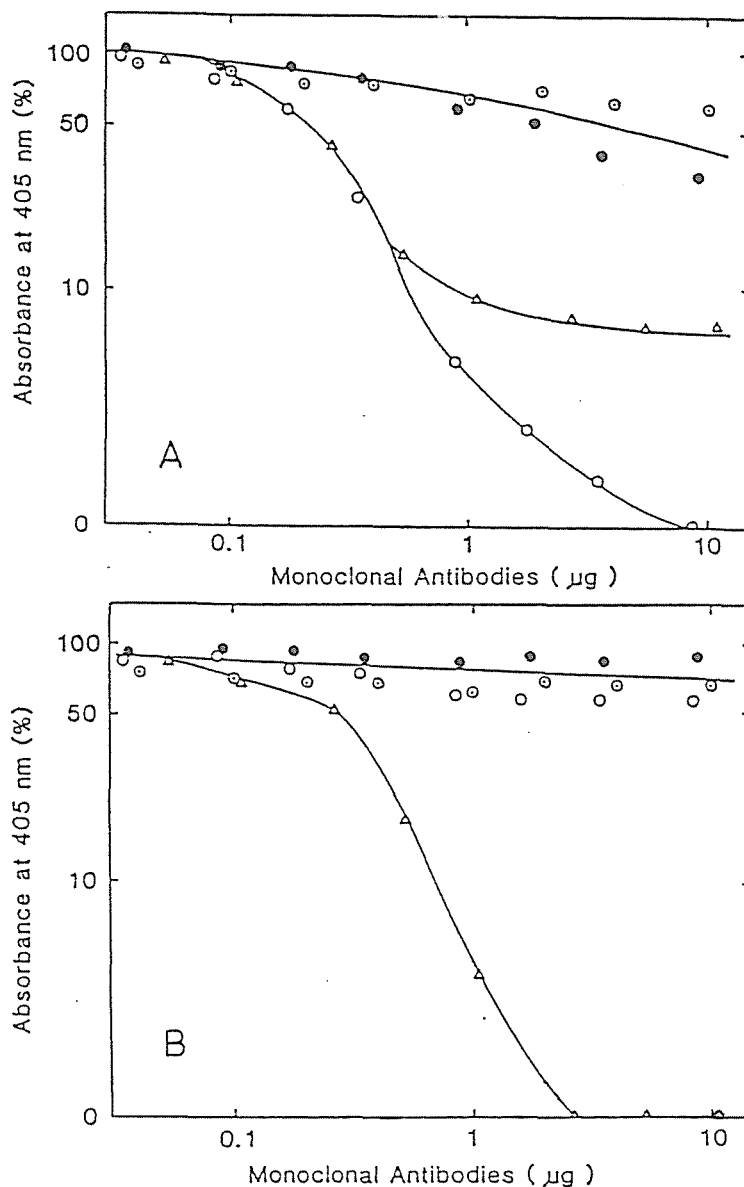


図 3-5 未標識単クローン性抗体によるアルカリホスファターゼ標識単クローン性抗体と毒素との結合の阻止

600 ng の C-ST 毒素をコーティングした ELISA プレートに種々の濃度の未標識単クローン性抗体存在下で、アルカリホスファターゼ標識した No. 9 (A) および No. 12 (B) 抗体を加え、37°C、2 時間インキュベートした。ELISA 緩衝液で 3 回洗浄後、図 3-4 と同様に酵素活性を測定した。No. 9 (○—○)、No. 12 (△—△)、No. 14 (⊙—⊙)、No. 17 (●—●) の 4 種を未標識単クローン性抗体として使用した。

ファクターゼ標識したNo. 12抗体について同様のことを調べたものである。未標識No. 12抗体は100%阻止したが、他の3種の未標識抗体は阻止しなかった。

考 察

著者らが作製した単クローン性抗体を使用し、 ^{125}I -毒素のラット脳シナプトゾームおよび GT1b への結合の阻止について調べた。さらに前者の結合を阻止した No. 12 抗体と後者の結合を阻止した No. 9 抗体について、毒素分子上の抗原決定部位の相互関係を考察した。

4 種の単クローン性抗体のうち、No. 12 抗体は ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合を強く阻止し、その ID_{50} は 26 ng で、この値は ^{125}I -毒素とほぼ等モルであった(図 3-1)。しかし、この No. 12 抗体は ^{125}I -毒素と GT1b との結合は阻止しなかった(図 3-2A)。一方、No. 9 抗体は ^{125}I -毒素と GT1b との結合は完全に阻止したが(図 3-2B)、毒素のシナプトゾームへの結合は部分的阻止にとどまった(図 3-1)。以上の結果より、No. 12 抗体は毒素のシナプトゾーム膜上のレセプターへの結合部位またはその近傍を、No. 9 抗体は毒素の GT1b への結合部位またはその近傍を認識していると考えられる。両抗体は毒素の重鎖を認識している(表 2-2)ので、毒素のシナプトゾームおよび GT1b への結合部位は重鎖上に存在すると考えられる。No. 12 抗体は C-ST 毒素を中和するが、No. 9 抗体は中和しない(表 2-3)ことから、毒素の毒性発現には、毒素が GT1b に結合することが必ずしも必要でないことが示唆され、

したがって毒素の真のレセプターは GT1b ではない可能性が提起される。

しかし、No. 12 抗体と No. 9 抗体に対する毒素分子上の抗原決定部位の関係は複雑である。アルカリホスファターゼ標識した No. 9 抗体と毒素との結合は、未標識の No. 12 抗体に部分的に、未標識 No. 9 抗体によって完全に阻止された(図 3-5A)。一方、アルカリホスファターゼ標識した No. 12 抗体と毒素との結合は、No. 12 抗体だけによって完全に阻止された(図 3-5B)。以上の結果から両単クローン性抗体に対する抗原決定部位の重鎖上における位置的関係を図示すると図 3-6 の様になる。No. 9 抗体の抗原決定部位は GT1b の結合部位とその周辺からなり、No. 12 抗体のそれはシナプトゾーム膜に存在する未知のレセプターの結合部位とその周辺からなっている。両抗体の抗原決定部位は一部で重複しあい、この重複した部分は No. 9 抗体と毒素との反応にとっては必須であり、No. 12 抗体と毒素との反応にとっては必須ではないと考えられる。

No. 17 抗体は C-ST 毒素を中和する(表 2-3, 2-4)にもかかわらず、 ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は阻止しなかった(図 3-1)。SIMPSON⁽³³⁾ の仮説を引用すれば、No. 17 抗体による中和は、毒素のレセプターへの結合以外、すなわち細胞内移行

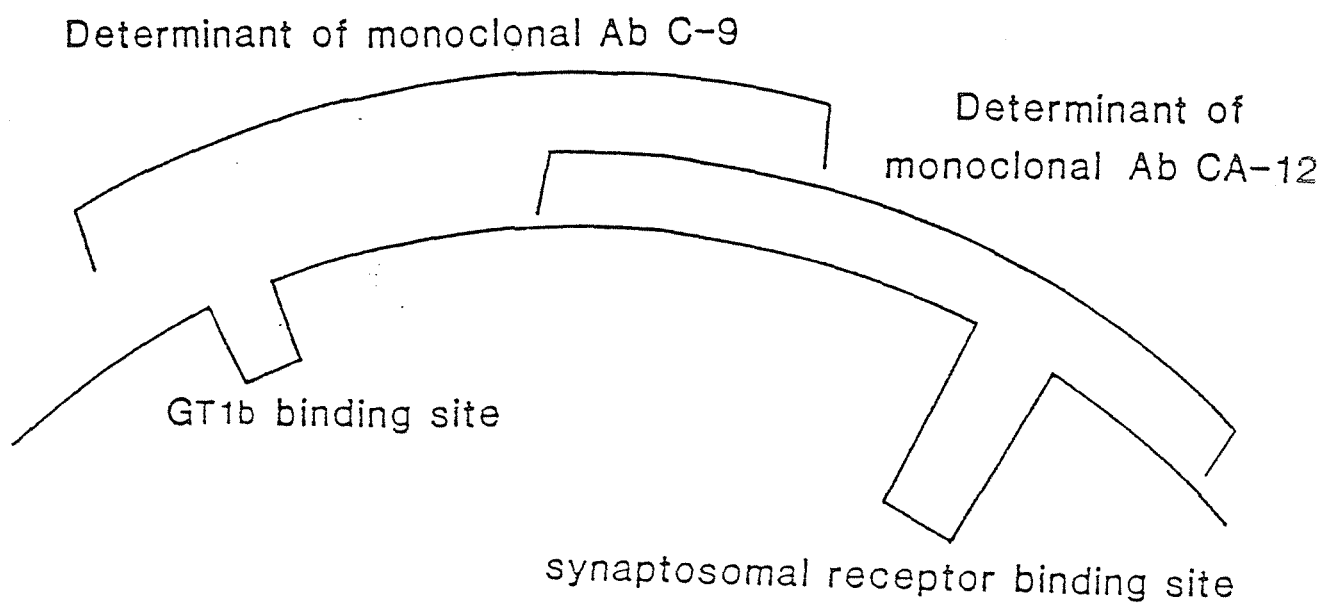


図 3-6 単クローン性抗体 No. 9 と No. 12 の抗原決定部位の想像図

あるいは細胞内での触媒的作用の阻止に起因していると考えられる。

第 4 章

ボツリヌスC型毒素重鎖のトリ
プシン限定分解によるフラグメ
ントの作製およびフラグメント
と単クローン性抗体、ラット脳
シナプトソーム、ガングリオシ
ド GT1b との反応について

要 旨

C-ST 毒素の重鎖をトリプシン限定分解し、分子量 40,000 のフラグメントを得た。このフラグメントは C-ST 毒素の重鎖を認識する 10 種の単クローン性抗体のうち、8 種の抗体に対する抗原決定部位を保持した。8 種の抗体の中には、 ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合を阻止する No. 12 抗体と ^{125}I -毒素と GT1b との結合を阻止する No. 9 抗体も含まれており、このフラグメント上には両者に対する抗原決定部位が含まれているにもかかわらず、フラグメントはシナプトゾームおよび GT1b への結合能を保持しなかった。

このフラグメントを認識する単クローン性抗体の中には D 型毒素を認識する抗体も含まれていることから、フラグメント上には C、D 型毒素の共通抗原部位が存在することが示唆される。

序 文

前章までにおいて毒素のシナプトゾームおよび GT1b への結合部位は重鎖上に存在することを、 ^{125}I -毒素と単クローン性抗体を用いて明らかにした。さらに重鎖上にはシナプトゾーム膜上のレセプターの結合部位と GT1b の結合部位が存在し、これらが単クローン性抗体に対する抗原決定部位と関連していることを推察した。

そこで本章では、上記のレセプターおよび GT1b の結合部位、または単クローン性抗体に対する抗原決定部位を分離する目的から、毒素重鎖をトリプシン限定分解し、フラグメントを得、そのフラグメントの性質について述べた。

材料および方法

重鎖のトリプシンによる限定分解

第一章で述べた方法により C-ST 毒素より精製された重鎖を硫酸塩析法により、約 1mg/ml の濃度に濃縮後、B-Nap で十分透析した。この重鎖溶液に 10mM HCl 溶液に溶解したトリプシン TPCK (284U/mg , Worthington Biochemical Corp., USA) を加え (重鎖: トリプシン = $100:3$ w/w)、 37°C で 36 時間インキュベートし、フラグメントを得た。大豆トリプシンインヒビター (Sigma, USA) をトリプシンと同量加えて反応をとめ、B-Nap で十分透析後、タンパク質量を 278nm の吸光度より測定した。吸光係数は C-ST 毒素の重鎖のもので代用した ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 12.02$)。

ディスク電気泳動

ディスク電気泳動は DAVIS⁽⁷⁾ の方法を一部改良して行った。すなわち 1.5M トリス-塩酸緩衝液 ($\text{pH } 8.9$) 中にアクリルアミド (モノアクリルアミド: ビスアクリルアミド $24:0.63$) を 6% に溶解し、 $0.5 \times 10\text{cm}$ のガラスカラム中でゲル化し、試料添加後、ゲル 1 本あたり 2mA で電気泳動を行った。電極液として $500\mu\text{M}$ トリス、 3.8mM グリシン緩衝液 ($\text{pH } 8.3$) を用いた。ゲルの染色、脱色は SDS-PAGE の場合と同様に行った。

ゲル内沈降反応

OUCHTERLONY⁽²⁷⁾の方法に準じて行った。アガロース GP-36 (羊井化学薬品) をベロナル緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.06, 常光) に 0.8% に溶解し、ゲル化した寒天平板に直径 6 mm の穴をあけ、抗毒素抗体および各種抗原を添加して、湿潤箱中で静置した。

単クローン性抗体

第2章で述べた No. 9, No. 12, No. 14 および No. 17 抗体の他に OGUMA⁽²⁶⁾らの作製した単クローン性抗体が分与された。これらの抗体は OGUMA らにより新たに名称変更が行われ、反応性、中和能が細分類された (表 4-1)。本章では C-ST 毒素重鎖と反応する抗体 10 種を使用し、前述の 4 種単クローン性抗体は次のように名称変更された。

No. 9 → C-9

No. 12 → CA-12

No. 14 → C-14

No. 17 → C-17

表 4-1 単クローン性抗体の性質^a

Antibody	ELISA				Neutralization									
	Toxin			Hc or Lc component	Type C					Type D				
	C-ST	D-1873	O-SA		ST	468	203	D6F	C819	6812	6813	1873	C816	SA 4947
C-9	+	-	-	Hc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-14	+	-	-	Hc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-17	+	-	-	Hc	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
N-C-45	+	-	-	? ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-C-109	+	-	-	?	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-26	-	+	-	Hc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-34	-	+	-	Hc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-D-16	-	+	-	Hc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-162	-	+	-	Hc	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-210	-	+	-	Hc	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-28	-	+	-	Hc	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
N-D-1	-	+	-	Hc	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
N-D-2	-	+	-	Hc	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
N-A-70	-	-	+	NT ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
N-A-145	-	-	+	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CA-12	+	-	+	Hc	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
N-CA-137	+	-	+	Hc	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
N-CA-11	+	-	+	Hc	±	±	±	±	±	-	-	-	-	+
N-CA-27	+	-	+	Hc	±	±	±	±	±	-	-	-	-	+
N-DA-20	-	+	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-DA-75	-	+	+	Lc	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
N-DA-122	-	+	+	Lc	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CDA-69	+	+	+	Hc	± ^d	±	±	±	±	±	±	±	±	±
N-CDA-14	+	+	+	Hc	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
N-CDA-175	+	+	+	Hc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDA-30	(+) ^e	+	+	Lc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-CDA-5	+	+	(+)	Lc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-CDA-135	+	+	(+)	Lc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a ELISA は 600ng の各毒素および重鎖、軽鎖と 100 倍希釈の腹水で行った。中和試験は各毒素と 50 倍希釈の腹水で行った。

b 両鎖ともに反応しなかった。

c 行わなかった。

d 20 倍希釈の腹水で中和

e 弱い反応

結 果

トリプシン限定分解による重鎖からのフラグメントの作製

図4-1は重鎖(200 μ g/ml)を $3/100$ 重量比のトリプシン存在下で37°C、各時間インキュベートし、反応液をSDS-PAGEで調べたものである。時間の経過とともに6つのフラグメントが出現した。これらを分子量の大きい順にH₁~H₆フラグメントと名付けた。それぞれの分子量はH₁: 76,000、H₂: 64,000、H₃: 58,000、H₄: 53,000、H₅: 46,000、H₆: 40,000であった(分子量はIgG、BSA、卵白アルブミン、キモトリプシン、ケトクロームCを標準タンパク質として求めた)。

重鎖溶液を濃縮し(1mg/ml)、 $3/100$ 重量比のトリプシンで37°C、36時間限定分解すると、H₆フラグメントだけが得られた。図4-2にそのSDS-PAGEとディスク電気泳動の染色パターンを示した。SDS-PAGEでは1本のバンドを得たが、ディスク電気泳動では幅の広いバンドであった。

図4-3にこのH₆フラグメントおよび毒素、重鎖、軽鎖と抗毒素血清とのゲル内沈降反応による沈降線を示した。H₆フラグメントは抗毒素血清との間に1本の沈降線を形成し、抗原的には均一であることが示された。またH₆フラグメントと毒素および重鎖とは抗原的に一部同一であったが、軽鎖と

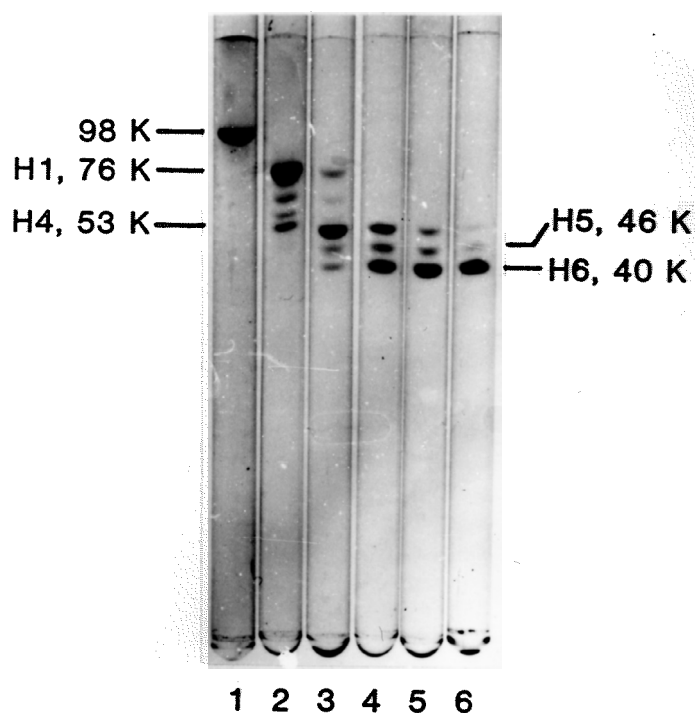


図4-1 重鎖のトリプシン限定分解

200 μ g/ml の C-ST 毒素重鎖に $\frac{3}{100}$ 重量比のトリプシンを加え B-Nap 中で 37°C、各時間インキュベートした。所定時間後 70 μ l ずつを抜き取り、1% SDS を加え、100°C、3 分間熱処理し、電気泳動を行った（泳動条件については「第一章、材料および方法」を参照）。分子量は IgG、BSA、卵白アルブミン、キモトリプシン、チトクローム C を標準タンパク質として求めた。(1) 重鎖、(2) 3 時間、(3) 6 時間、(4) 12 時間、(5) 24 時間、(6) 36 時間

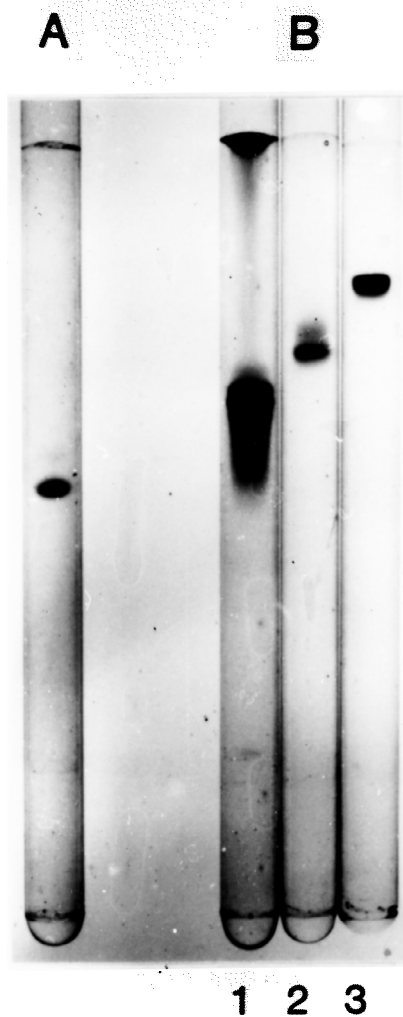


図4-2 H₆フラグメントのアクリルアミドゲル電気泳動

A. 1mg/mlのC-ST 毒素重鎖に $\frac{3}{100}$ 重量比のトリプシンを加え、B-Nap中で37°C、36時間インキュベートし、1% SDSを加え、100°C、3分間熱処理し、図4-1と同様条件で電気泳動を行った。

B. Aで得られたH₆(1)、および重鎖(2)、毒素(3)についてディスク電気泳動を行った(泳動条件については“材料および方法”を参照)。

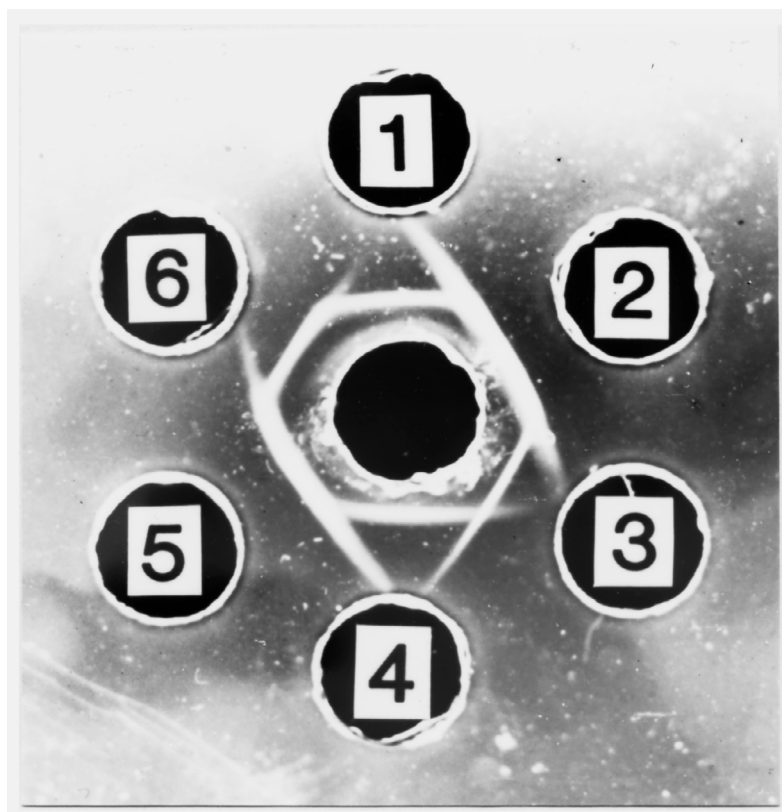


図 4-3 H₆フラグメントのゲル内沈降反応

1, 4 - H₆フラグメント、6 - 重鎖、2, 5 - 毒素、
3 - 軽鎖、中央の well は抗毒素抗体を用いた（そ
の他の条件については“材料および方法”を参照）。

は抗原性を異にした。

H₆フラグメントと単クローン性抗体との反応

表4-1に示した単クローン性抗体のうち、C-ST毒素の重鎖を認識する抗体10種とC-ST毒素との反応に対するH₆フラグメントの阻止能をELISAで調べた(図4-4)。CDA-69抗体とN-CDA-14抗体を除き他の8種の抗体はH₆フラグメントと反応し、特にNo. 12(CA-12)抗体は最も強く反応した。このことからH₆フラグメント中にはCDA-69、N-CDA-14両抗体に対する抗原決定部位は存在しないが、他の8種の単クローン性抗体に対する抗原決定部位は存在していることがわかった。

図4-5はNo. 12(CA-12)抗体と毒素との反応を、毒素、重鎖およびH₆フラグメントを阻害剤として加えELISAで調べたものである。毒素と重鎖とを比べると重鎖の阻止能は毒素に比べてそれほど減少しなかったが、H₆フラグメントのそれはかなり減少した。このことはトリプシン限定分解によりNo. 12(CA-12)抗体との親和性が減少したことを示している。H₆フラグメントと反応した他の7種の抗体について同様の実験を行い、それぞれのH₆フラグメントによるID₅₀と毒素および重鎖のID₅₀との比をとり比較した(表4-2)。H₆フラグメントと一番強く反応したNo. 12(CA-12)抗体はH₆/Heavy chain(ID₅₀)で670、H₆/Toxin(ID₅₀)で2,100

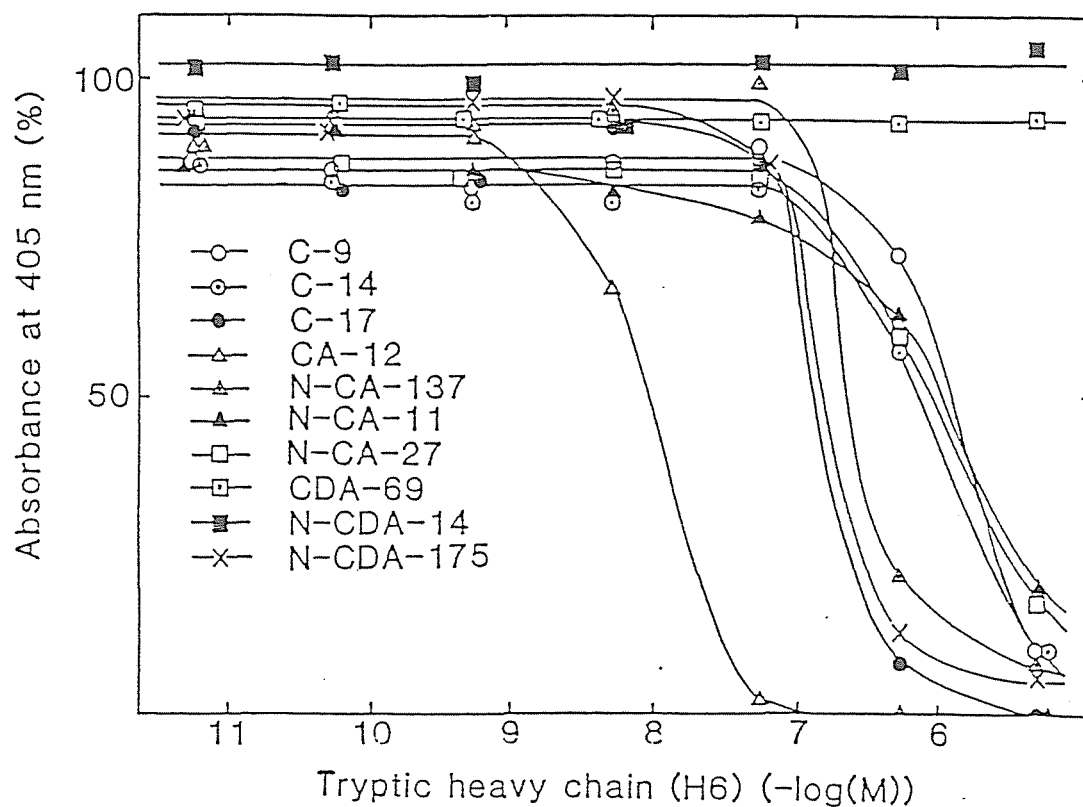


図4-4 H₆フラグメントによる単クローン性抗体と毒素との反応の阻止

600 ng の C-ST 毒素をコーティングした ELISA プレートに種々の濃度の H₆ フラグメント存在下で各種単クローン性抗体を 37°C、2 時間インキュベートし、ELISA 緩衝液で洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG (特異的ウサギ Ig) を加え、37°C、2 時間インキュベートした。以下図 3-4 と同様に酵素活性を測定した。使用した単クローン性抗体の種類は図中に示した。

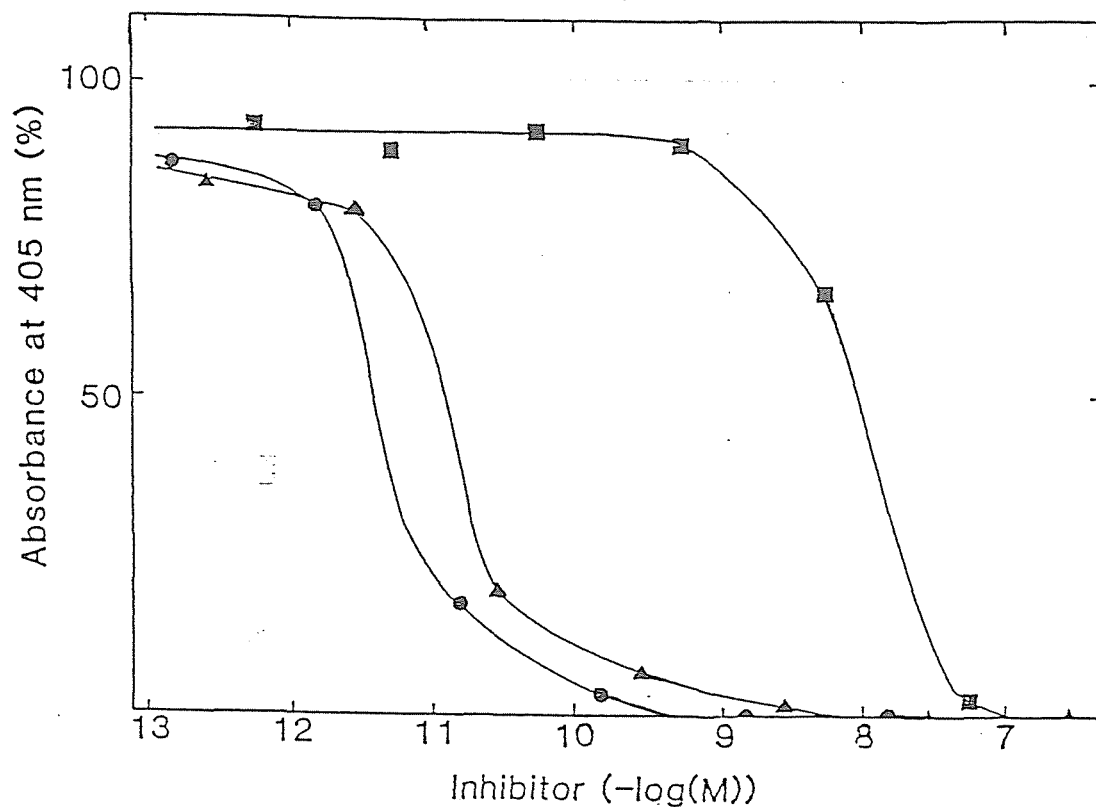


図4-5 毒素、重鎖およびH₆フラグメントによる
単クローン性抗体No. 12 (CA-12)と毒素との反応の
阻止

600ng のC-ST毒素をコーティングしたELISAプレートに種々の濃度の毒素(●—●)、重鎖(▲—▲)およびH₆フラグメント(■—■)存在下で、単クローン性抗体No. 12 (CA-12)を添加し37°C、2時間インキュベートし、ELISA緩衝液で洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG(特異的ウサギIg)を加え、37°C、2時間インキュベートした。以下図3-4と同様に酵素活性を測定した。

表 4-2 H₆フラグメントと重鎖および毒素の ID₅₀
の比^a

The ratio of ID 50		
M.C.Ab	H ₆ /H _C	H ₆ /Tox
C-9	72	1300
C-14	92	2000
C-17	87	1000
CA-12	670	2100
N-CA-137	310	1600
N-CA-11	55	1900
N-CA-27	340	2800
CDA-69	—	—
N-CDA-14	—	—
N-CDA-175	2.4	110

^a 各単クローン性抗体について図4-5と同様の実験を行い、各阻害剤の ID₅₀ を求め、その比を算出した。

とかなり高く、トリプシン処理によって抗体との親和性がかなり減少したことがわかった。N-CDA-175では H₆/Heavy chain (ID₅₀) で 2.4、H₆/Toxin (ID₅₀) で 110 と一番低く、トリプシン処理による抗体との親和性の減少が一番少ないことがわかった。

毒素構成々分のシナプトゾームおよび GT1b への結合

図4-6 は毒素、重鎖、軽鎖および H₆フラグメントによる ¹²⁵I-毒素のシナプトゾームへの結合の阻害について調べたものである。毒素および重鎖は ¹²⁵I-毒素のシナプトゾームへの結合を阻害したが軽鎖は阻害しなかった。このことから毒素のシナプトゾームへの結合は重鎖がになっていることが示唆される。また、毒素の阻害曲線は2相性を示し、おのこの ID₅₀ は 8.0×10^{-11} M および 3.5×10^{-8} M であった。¹²⁵I-毒素とシナプトゾームとの平衡結合実験より得られた K_d と未標識毒素の K_d との関係は次の様になる⁽¹⁴⁾。

$$K_{0.5} = K_d \left(1 + \frac{[T^*]_{0.5}}{*K_d} \right)$$

ここで K_d および *K_d はそれぞれ未標識毒素の解離定数と ¹²⁵I-毒素の解離定数を示す。K_{0.5} は 50% 阻害を示す未標識毒素の濃度、[T*]_{0.5} は 50% 阻害時の未結合の ¹²⁵I-毒素の濃度を示す。*K_d は図1-4 より 9.52×10^{-11} M および 2.00×10^{-9} M、[T*]_{0.5} は図4-6

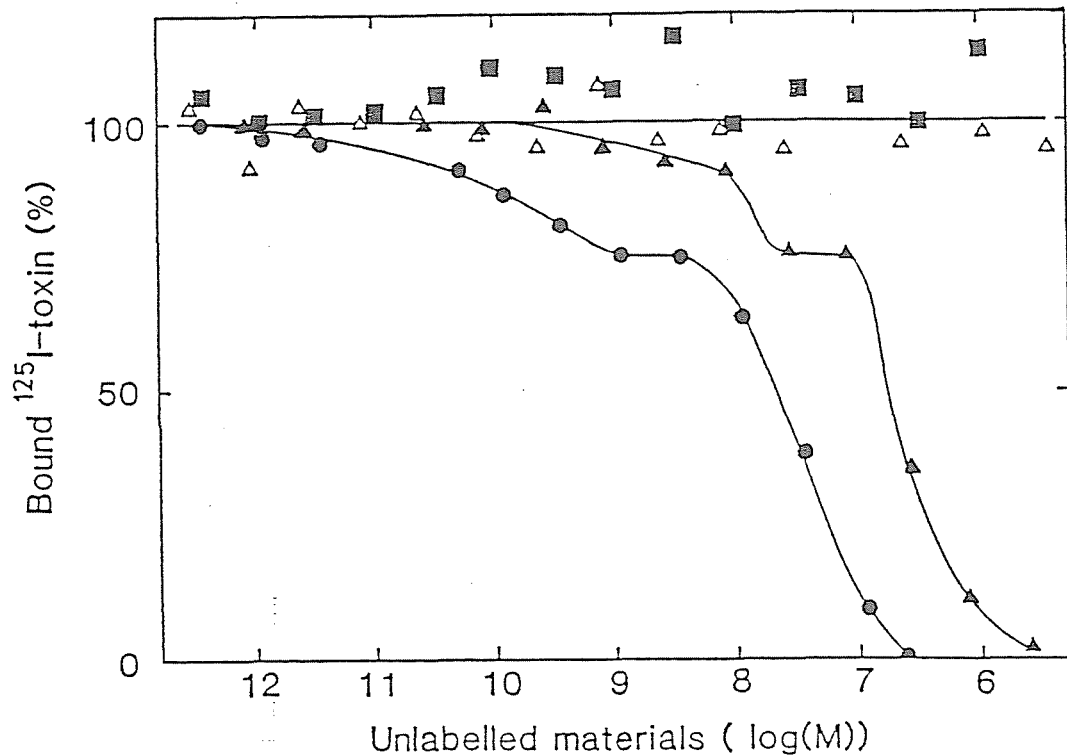


図 4-6 毒素およびその構成成分による ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合の阻止

^{125}I -毒素 $2.13 \times 10^{-12} \text{ M}$ を $100 \mu\text{g}$ (タンパク質) / ml のシナプトゾームと、種々の濃度の毒素 (●—●)、重鎖 (▲—▲)、軽鎖 (△—△)、および Hb フラグメント (■—■) 存在下で、 0°C 、10 分間インキュベートし、GF/c フィルターでろ過し、フィルター上に残った放射活性を測定した。 $2.48 \times 10^{-6} \text{ M}$ の未標識毒素存在下での ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合をすべての値から差し引いた。

の実験条件より 1.39×10^{-12} M および 1.81×10^{-12} M なので、未標識毒素の解離定数は、高親和性の結合では $K_d = 7.9 \times 10^{-11}$ M、低親和性の結合では $K_d = 3.5 \times 10^{-8}$ M となる。これらの値は第2章の ^{125}I -毒素とシナプトゾームとの平衡結合実験より求めた ^{125}I -毒素の K_d 値とほぼ一致した。

重鎖の阻害曲線も2相性を示した。重鎖の K_d 値は $[T^*]_{0.5}$ 値が重鎖の $K_{0.5}$ 値 (50% 阻害を示す未標識重鎖の濃度) に比べて遙かに小さいので重鎖の $K_{0.5}$ 値で代用でき、その値は 1.2×10^{-8} M および 2.4×10^{-7} M であった。

H6フラグメントは、 ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合を阻止する No.12 (CA-12) 抗体 (図3-1) の抗原決定部位が存在するにもかかわらず、シナプトゾームへの結合はみられなかった。

図4-7は毒素、重鎖、軽鎖および H6フラグメントによる ^{125}I -毒素と GT1b との結合の阻害について調べたものである。 ^{125}I -毒素と GT1b との結合は ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合の場合と同様に毒素と重鎖により阻害され、軽鎖によつては阻害されなかった。このことから毒素と GT1b との結合も重鎖がになっていることが示唆される。H6フラグメントは、 ^{125}I -毒素と GT1b との結合を阻止する No.9 (C-9) 抗体 (図3-3 B) の抗原決定部位が存在するにもかかわらず、GT1b との結合はみられなかった。

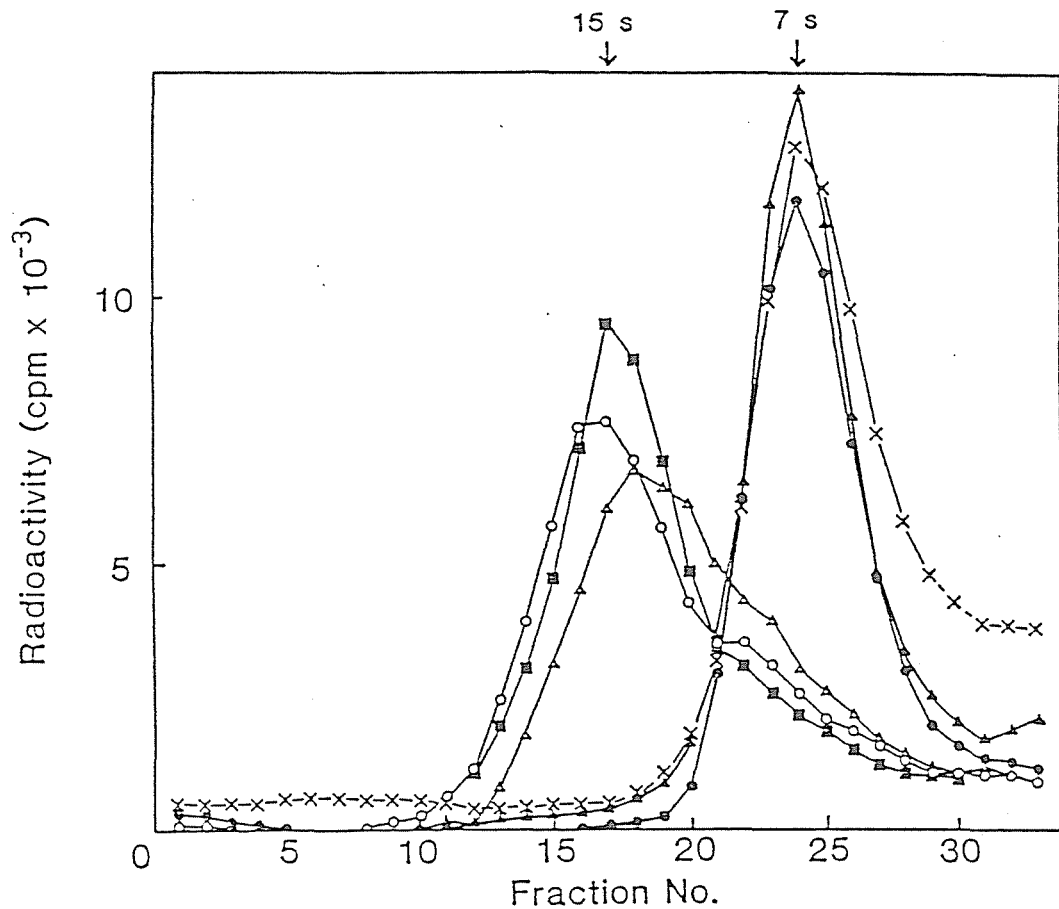


図4-7 毒素およびその構成々分による ^{125}I -毒素と GT1b との結合の阻害

140 fmol の ^{125}I -毒素と $4\mu\text{g}$ の GT1b を 1.4 nmol の未標識毒素およびその構成々分存在下で、 $500\mu\text{l}$ の Inc. m. 中で 37°C 、20 分間インキュベートし、図3-2と同様にシヨ糖密度勾配遠心を行い、各画分について放射活性を計測した。●—●： ^{125}I -毒素。

○—○： ^{125}I -毒素 + GT1b、x—x： ^{125}I -毒素 + GT1b + 未標識毒素、▲—▲： ^{125}I -毒素 + GT1b + 未標識重鎖、△—△： ^{125}I -毒素 + GT1b + 未標識軽鎖、■—■： ^{125}I -毒素 + GT1b + 未標識 H6 フラグメント

考 察

前章までにおいて、毒素分子上のラット脳シナプトソームおよび GT1b への結合部位が重鎖に存在することが、抗重鎖抗体および単クローン性抗体を用いて明らかにされた。本章では重鎖自身を用い、 ^{125}I -毒素のシナプトソームおよび GT1b への結合の阻害を調べた(図4-6 および図4-7)。軽鎖は ^{125}I -毒素のシナプトソームおよび GT1b への結合を阻止しなかったが、重鎖は ^{125}I -毒素の両者への結合を未標識毒素と同様に阻害した。特に重鎖による ^{125}I -毒素のシナプトソームへの結合の阻害曲線は2相性を示し、この ID_{50} から2種類の K_d が得られた($1.2 \times 10^{-8} \text{ M}$ および $2.4 \times 10^{-7} \text{ M}$)。重鎖の K_d は未標識毒素による ^{125}I -毒素のシナプトソームへの結合阻害曲線より求めた K_d ($7.9 \times 10^{-11} \text{ M}$ および $3.5 \times 10^{-8} \text{ M}$)に比べかなり高かったが、2種類存在することから毒素のそれを反映するものと考えられる。重鎖の結合定数の増加は重鎖の分離による高次構造の損傷および 0°C における保存による一部変性と考えられる。以上の結果からシナプトソーム膜上に存在する真のレセプターおよび GT1b の結合部位は重鎖分子上に存在することが推察された(図3-6)。

重鎖をトリプシンで限定分解し、フラグメントを得、そのフラグメントについて、単クローン性

抗体に対する抗原決定部位の有無とシナプトゾームおよび GT1b への結合能の有無について調べた。

重鎖を 3/100 重量比のトリプシンで限定分解を続けると、時間とともに 6 つのフラグメントが得られるが、濃縮重鎖のトリプシン限定分解 (37°C、36 時間) により、SDS-PAGE で単一バンドを示す分子量 40,000 の H₆フラグメントを得た。H₆フラグメントは、ディスク電気泳動では幅の広いバンドであったが (図 4-2)、抗毒素血清によるゲル内沈降反応 (図 4-3) では抗原的に均一性を示した。したがって、H₆フラグメントは両末端部位の塩基性アミノ酸残基部分に若干の多様性が存在するが、重鎖分子の限定部分から得られたフラグメントであることが推察される。

C-ST 毒素重鎖を認識する単クローン性抗体 10 種のうち 8 種が H₆フラグメントと反応した (図 4-4)。H₆フラグメントの分子量は重鎖 (M.W. 98,000) の半分以下にもかかわらず、重鎖の抗原性は H₆フラグメント上にかなり保存された。¹²⁵I-毒素のシナプトゾームへの結合を阻止する No. 12 (CA-12) 抗体および ¹²⁵I-毒素と GT1b との結合を阻止する No. 9 (C-9) 抗体に対する抗原決定部位も H₆フラグメント上に保存された。しかし H₆フラグメント自身は ¹²⁵I-毒素のシナプトゾームおよび GT1b への結合を阻害しなかった (図 4-6 および図 4-7)。この理由とし

て次の三者が考えられる。(1)トリプシンにより2つの単クローン性抗体の抗原決定部位の一次構造は切断されなかったが、その近傍に存在するレセプターへの結合部位の一次構造が切断された。(2)レセプターへの結合部位の一次構造は保存されたがその高次構造が破壊された。(3)レセプターと重鎖との結合は、重鎖分子上においてレセプターの結合部位から遠く離れたペプチドによっても立体構造的に依存しており、それがトリプシンにより切断されてしまった。

ボツリヌス菌と同じクロストリジウム属に分類されるテタヌス菌の産生するテタヌス毒素はボツリヌス毒素と構造が類似⁽²³⁾し、その重鎖がガングリオシドと結合することが知られている。^(20, 41, 42) HELTING^(10, 11)らはテタヌス毒素をパパインで切断し、重鎖に由来し、ガングリオシド結合性を有するフラグメントCを得た。一方、BIZZINI⁽¹⁾らは粗テタヌス毒素を凍結融解し、重鎖に由来し、ガングリオシド結合性を有するB-II_Bフラグメントを得た、これら両⁽²⁾フラグメントは同一のものであることがBIZZINIらにより示された。ボツリヌス毒素の場合も、パパインによる消化で同様のフラグメントが得られる可能性が残されている。

なお、H₆フラグメントに反応する8種の単クローン性抗体の中にD型毒素とも反応する抗体が含ま

まれる。したがって H₆フラグメントをさらに種々のタンパク分解酵素および試薬で処理することにより、C、D型毒素の共通抗原部位を分離する可能性が残されている。

総 括

Clostridium botulinum C型 Stockholm 株の産生する神経毒素を ^{125}I -標識し、多クローン性抗体および単クローン性抗体を用い、毒素の構造、抗原決定部位およびレセプターへの結合について調べた。

^{125}I -毒素のラット脳シナプトソームへの結合は温度 (0°C および 37°C) に依存せず、10分間で平衡に達するきわめて速い反応であった。 ^{125}I -毒素とシナプトソームとの 0°C 、10分間での平衡結合実験から、シナプトソーム膜上に2種類のレセプターの存在が示唆され、その結合定数と最大結合量はそれぞれ $1.05 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $5.26 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ mol/mg}$ シナプトソームタンパク質 および $5.00 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、 $5.00 \times 10^{-12} \text{ mol/mg}$ シナプトソームタンパク質であった。未標識毒素による ^{125}I -毒素のシナプトソームへの結合阻害曲線からも、シナプトソーム膜上に2種類のレセプターの存在が示唆され、その結合定数は $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ および $2.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ で、平衡結合実験の値とほぼ一致した。

^{125}I -毒素を 0°C でシナプトソームに結合させた後、さらに 0°C および 37°C でインキュベーションを継続し、所定時間ごとに過剰の未標識毒素を加えて結合した ^{125}I -毒素を解離させると、 37°C でインキュベーションした場合、そのインキュベーションした時間

に応じて解離されない ^{125}I -毒素量が増加し、最終的に結合した ^{125}I -毒素量の約 0.4 % がシナプトゾームから解離しなかった。このことは結合した ^{125}I -毒素の一部が 37°C ではシナプトゾーム膜内あるいはシナプトゾーム内に侵入したことを示唆する。

^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合は抗重鎖抗体および重鎖を認識し中和能を有する単クローン性抗体 No. 12 (CA-12) によって阻止されることおよび未標識重鎖自身により拮抗的に阻害されることから、毒素のシナプトゾームへの結合は重鎖によることが明らかとなった。さらに未標識重鎖による ^{125}I -毒素のシナプトゾームへの結合阻害曲線は未標識毒素のそれと同様 2 相性を示し、重鎖上に 2 種類のレセプター結合部位が存在することを示唆する。この阻害曲線より求めた重鎖のシナプトゾームへの結合定数は $8.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ および $4.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。

^{125}I -毒素とガングリオシド GT1b との結合は抗重鎖抗体、重鎖を認識する単クローン性抗体 No. 9 (C-9) および未標識重鎖によって阻害された。したがって、毒素と GT1b との結合もまた重鎖がになっていることが示唆される。No. 9 (C-9) 抗体は中和能を持たないことから、GT1b は毒素の真のレセプターでない可能性が考えられる。

アルカリホスファターゼ標識した No. 12 (CA-12) 抗体と毒素との結合は、4種の未標識単クローン性抗体 (No. 9 (C-9)、No. 12 (CA-12)、No. 14 (C-4)、No. 17 (C-17)) のうち、No. 12 (CA-12) 抗体だけにより阻止を受けた。一方アルカリホスファターゼ標識した No. 9 (C-9) 抗体と毒素との結合は同じく4種の未標識抗体のうち、No. 9 (C-9) 抗体により完全に、No. 12 (CA-12) 抗体により部分的に阻止を受けた。

以上の結果から次のことを推論した。重鎖上にはシナプトゾーム膜上の真のレセプターに対する結合部位と GT1b に対する結合部位が存在し、No. 9 (C-9) 抗体は重鎖上の GT1b に対する結合部位またはその近傍を、No. 12 (CA-12) 抗体はシナプトゾーム膜上の真のレセプターに対する結合部位またはその近傍を認識しており、両抗体の認識部位は一部で重複し、その重複した部分は No. 9 (C-9) 抗体と毒素との反応にとって必須である。

重鎖分子からレセプターの結合部位および単クローン性抗体の抗原決定部位を分離する目的で、重鎖をトリプシン限定分解し、分子量 40,000 の H₆ フラグメントを得た。H₆ フラグメントはディスク電気泳動では幅の広いバンドとして検出されたが、ゲル内沈降反応より抗原的に均一であることが示された。したがって H₆ フラグメントは両末端部位の塩基性アミノ酸残基部分に若干の多様性が存在

するものの、重鎖分子の限定部分から得られたフラグメントであることが推察される。

H₆フラグメントは重鎖と反応する単クローン性抗体10種のうち8種と反応し、重鎖の抗原性をかなりよく保持していた。反応した8種の抗体の中には No. 9 (C-9) および No. 12 (CA-12) 抗体が含まれているにもかかわらず、H₆フラグメントはシナプトゾームおよび GT1b への結合能を有していなかった。これはトリプシン処理により抗原性だけが保持されセプターへの結合に関与する構造が破壊されたためと考えられる。

謝 辞

本論文の作製にあたり、終始御指導頂きました北海道大学獣医学部久保周一郎教授、内貴正治助教授、首藤文栄助手、加藤憲夫助手および教室員の皆様に厚く感謝致します。また貴重な御助言を頂いた北海道大学医学部飯田広夫教授、札幌医科大学小熊恵二教授に厚く感謝致します。

最後に本論文を御校閲頂いた北海道大学獣医学部梁川 良教授、橋本信夫教授、伊澤久夫教授に深謝の意を表します。

文 献

- [1] Bizzini, B., Stoeckel, K., & Schwab, M. (1977): An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: Chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems. J. Neurochem., 28, 529-542
- [2] Bizzini, B., Grob, P., & Akert, K. (1981): Papain-derived fragment IIc of tetanus toxin: Its binding to isolated synaptic membranes and retrograde axonal transport. Brain Res., 210, 291-299
- [3] Bolton, A.E. & Hunter, W.M. (1973): The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. Biochem. J., 133, 529-539
- [4] Boroff, D.A. & Fleck, U. (1966): Statistical analysis of a rapid in vivo method for the titration of toxin of Clostridium botulinum. J. Bacteriol., 92, 1580-1581
- [5] Burgen, A.S.V., Dickens, F., & Zatman, L.J. (1949): The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. J. Physiol., 109, 10-24
- [6] Cull-Candy, S.G., Lundh, H., & Thesleff, S. (1976): Effects of botulinum toxin on neuromuscular transmission in the rat. J. Physiol., 260, 177-203
- [7] Davis, B.J. (1964): Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. Anals N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427

- [8] Habernann, E. (1974): ^{125}I -labeled neurotoxin from *Clostridium botulinum* A: Preparation, binding to synaptosomes and ascent to the spinal cord. *Naunyun-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.*, 281, 47-56
- [9] Haga, T. (1971): Synthesis and release of [^{14}C]acetylcholine in synaptosomes. *J. Neurochem.*, 18, 781-798
- [10] Helting, T.B. & Zwisler, O. (1977): Structure of tetanus toxin. I. Breakdown of the toxin molecule and discrimination between polypeptide fragments. *J. Biol. Chem.*, 252, 187-193
- [11] Helting, T.B., Zwisler, O., & Wiegandt, H. (1977): Structure of tetanus toxin. II. Toxin binding to ganglioside. *J. Biol. Chem.*, 252, 194-198
- [12] Hirokawa, N. & Kitamura, M. (1975): Localization of radioactive ^{125}I -labelled botulinus toxin at the neuromuscular junction of mouse diaphragm. *Naunyun-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.*, 287, 107-110
- [13] Hirokawa, N. & Heuser, J.E. (1981): Structural evidence that botulinum toxin blocks neuromuscular transmission by impairing the calcium influx that normally accompanies nerve depolarization. *J. Cell Biol.*, 88, 160-171
- [14] Hugues, M., Duval, D., Kitabgi, P., Lazdunski, M. & Vincent, J.P. (1982): Preparation of a pure monoiodo derivative of the bee venom neurotoxin apamin and its binding properties to rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 257, 2762-2769

- [15] Jansen, B.C. (1971): The toxic antigenic factors produced by Clostridium botulinum Type C and D. Onderstepoort J. Vet. Res., 38, 93-98
- [16] Kitamura, M. (1976): Binding of botulinum neurotoxin to the synaptosomes fraction of rat brain. Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol., 295, 171-175
- [17] Kitamura, M., Iwamori, M., & Nagai, Y. (1980): Interaction between Clostridium botulinum neurotoxin and gangliosides. Biochim. Biophys. Acta, 628, 328-335
- [18] 小崎俊司、富樫史朗、坂口玄二、岩森正男、永井克孝(1980): ホツリヌス神経毒成分のカングリオシドによる不活化。第93回日本獣医学会講演要旨集、p 117
- [19] Köhler, G. & Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256, 495-497
- [20] Ledley, F.D., Lee, G., Kohn, L.D., Habig, W.H., & Hardegree, M.C. (1977): Tetanus toxin interactions with thyroid plasma membranes: Implications for structure and function of tetanus toxin receptors and potential pathophysiological significance. J. Biol. Chem., 252, 4049-4055
- [21] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275

- [22] Martin, R.G. & Ames, B.N. (1961): A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. J. Biol. Chem., 236, 1372-1379
- [23] Matsuda, M. & Yoneda, M. (1975): Isolation and purification of two antigenically active, "complementary" polypeptide fragments of tetanus neurotoxin. Infect. Immun., 12, 1147-1153
- [24] Oguma, K., Syuto, B., Iida, H., & Kubo, S. (1980): Antigenic similarity of toxins produced by Clostridium botulinum type C and D strains. Infect. Immun., 30, 656-660
- [25] Oguma, K., Syuto, B., Agui, T., Iida, H., & Kubo, S. (1981): Homogeneity and heterogeneity of toxins produced by Clostridium botulinum type C and D strains. Infect. Immun. 34, 382-388
- [26] Oguma, K., Murayama, S., Syuto, B., Iida, H., & Kubo, S. (1984): Analysis of antigenicity and structure of Clostridium botulinum type C₁ and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. Infect. Immun., in press
- [27] Ouchterlony, O. (1953): Antigen-antibody reaction in gels. IV. Types of reaction in coordinated systems of diffusion. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 32, 231-240
- [28] Reisner, A.H., Nemes, P., & Bucholtz, C. (1975): The use of Coomassie brilliant blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on

- polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 64, 509-516
- [29] Righetti, P. & Drysdale, J.W. (1971): Isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Biochim. Biophys. Acta, 236, 17-28
- [30] Simpson, L.L. (1974): Studies on the binding of botulinum toxin type A to the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. Neuropharmacol., 13, 683-691
- [31] Simpson, L.L. (1979): Studies on the mechanism of action of botulinum toxin. In: Advances in Cytopharmacology volume 3 Neurotoxins: Tools in neurobiology, 27-34, Ed. Cecarelli, B. & Clementi, F.: Raven Press (New York)
- [32] Simpson, L.L. (1980): Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin type A and the cholinergic neuromuscular junction. J. Pharmacol. Exptl Ther., 212, 16-21
- [33] Simpson, L.L. (1981): The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. Pharmacol. Rev., 33, 155-188
- [34] Simpson, L.L. (1981): Pharmacological studies on the cellular and subcellular effects of botulinum toxin. In: Biomedical Aspects of Botulism, 35-46, Ed. Lewis, G.E.J.: Academic Press (New York)
- [35] Simpson, L.L. & Rapport, M.M. (1971): The binding of botulinum toxin to membrane lipids: sphingolipids, steroids and fatty acids. J. Neurochem., 18, 1751-1759
- [36] Stern, M. & Wentzel, L.M. (1950): A new method for the

- large-scale production of high-titer botulinum formol-toxoid types C and D. J. Immunol., 65, 175-183
- [37] Sugiyama, H. (1980): Clostridium botulinum neurotoxin. Microbiol. Rev., 44, 419-448
- [38] Syuto, B. & Kubo, S. (1977): Isolation and molecular size of Clostridium botulinum type C toxin. Appl. Environ. Microbiol., 33, 400-405
- [39] Syuto, B. & Kubo, S. (1978): Purification and characterization of Clostridium botulinum type C toxin. Jpn. J. Med. Soc. Biol., 31, 169-170
- [40] Syuto, B. & Kubo, S. (1981): Separation and characterization of heavy and light chains from Clostridium botulinum type C toxin and their reconstitution. J. Biol. Chem., 256, 3712-3717
- [41] Van Heiningen, W.E. (1959): Tentative identification of the tetanus toxin receptor in nervous tissue. J. Gen. Microbiol., 20, 310-320
- [42] Van Heiningen, W.E. (1974): Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin. Nature, 249, 415-417
- [43] Weber, K., Pringle, J.R., & Osborn, M. (1972): Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. In: Methods in Enzymology volume 26, 3-27, Ed. Hirs, C.H.W. & Timasheff, S.N.: Academic Press (New York)

- [44] Whittaker, V.P., Michaelson, I.A., & Kirkland, R.J.A. (1964):
The separation of synaptic vesicles from nerve-ending
particles ('synaptosomes'). *Biochem. J.*, 90, 293-303
- [45] Williams, R.S., Tse, C.K., Dolly, J.O., Hambleton, P., &
Melling, J. (1983): Radioiodination of botulinum neurotoxin
type A with retention of biological activity and its binding
to brain synaptosomes. *Eur. J. Biochem.*, 131, 437-445
- [46] Wonnacott, S. (1980): Inhibition by botulinum toxin of
acetylcholine release from synaptosomes: Latency of action
and the role of gangliosides. *J. Neurochem.*, 34, 1567-1573
- [47] Wonnacott, S. & Marchbanks, R.M. (1976): Inhibition by
botulinum toxin of depolarization-evoked release of
[¹⁴C]acetylcholine from synaptosomes in vitro. *Biochem. J.*,
156, 701-712
- [48] Wonnacott, S., Marchbanks, R.M., & Fiol, C. (1978): Ca^{2+}
uptake by synaptosomes and its effect on the inhibition of
acetylcholine release by botulinum toxin. *J. Neurochem.*,
30, 1127-1134
- [49] Zacks, S.I., Metzger, j. F., Smith, C.W., & Blumberg, J.M.
(1962): Localization of ferritin-labelled botulinus toxin
in the neuromuscular junction of the mouse. *J. Neuropathol.*
Exp. Neurol., 21, 610-633
- [50] Zacks, S.I., Rhodes, M.V., & Sheff, M.F. (1968): The
localization of botulinum A toxin in the mouse. *Exp. Molec.*

Pathol., 9, 77-83

THE BINDING TO RECEPTOR AND THE STRUCTURE OF CLOSTRIDIUM
BOTULINUM TYPE C TOXIN

Takashi AGUI

Department of Biochemistry

Faculty of Veterinary Medicine

Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

The binding of Clostridium botulinum type C toxin to rat brain synaptosomes and ganglioside G_{T1b} was determined by the use of ^{125}I -labeled toxin and the polyclonal and monoclonal antibodies specific for the toxin. The relationship in the antigenic sites of monoclonal antibodies and binding sites to receptors on the toxin molecule also was investigated.

The binding of ^{125}I -toxin to synaptosomes was independent of the incubation temperature (0°C and 37°C) and was equilibrated in 10 min. The both of the dose dependences of ^{125}I -toxin binding to synaptosomes at 0°C and the competitive inhibition of the binding of ^{125}I -toxin to synaptosomes at 0°C by unlabeled toxin showed that there were two kinds of toxin receptors on the synaptosomal membrane. The association constants and the maximum binding values determined in the former experiment were $1.05 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $5.25 \times 10^{-13} \text{ mol/mg}$ of synaptosomal protein for high affinity and $5.00 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, $5.00 \times 10^{-12} \text{ mol/mg}$ of synaptosomal protein for low affinity, respectively. These association constants were similar to those obtained from the later experiment, $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ for

high affinity and $2.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for low affinity.

When the incubation of toxin with synaptosomes was continued at 37°C after ^{125}I -toxin had been pre-incubated with synaptosomes at 0°C for 10 min, the displacement of labeled toxin by the addition of excess amounts of unlabeled toxin decreased slightly with increasing incubation time, and finally 0.4% of the bound ^{125}I -toxin was not displaced from synaptosomes. This result suggests that a small amount of the bound toxin is incorporated into the synaptosomal membrane or synaptosomes for the incubation at 37°C.

The binding of ^{125}I -toxin to synaptosomes was inhibited by anti-heavy chain IgG and a monoclonal antibody, No. 12 (CA-12), which neutralized the toxicity of type C toxin and recognized the heavy chain. The binding was also inhibited competitively as in two steps by the addition of increasing amounts of unlabeled heavy chain, although two kinds of association constants of heavy chain to synaptosomes were lower than those of the parental toxin. These results indicate that the heavy chain contributes to the binding of the toxin to synaptosomes, and that No. 12 (CA-12) antibody recognizes the binding site to toxin receptor on synaptosomal membrane or near the site. The less effect of heavy chain in the inhibition may be due to the denaturation of heavy chain during the preparation.

The binding of ^{125}I -toxin to G_{T1b} was inhibited by anti-heavy chain IgG and a monoclonal antibody, No. 9 (C-9), which

recognized heavy chain. Furthermore, the binding was inhibited competitively by unlabeled heavy chain, and these results suggest that the binding site of toxin to G_{T1b} localizes on the heavy chain and No. 9 (C-9) antibody recognizes the binding site to G_{T1b} or near the site. Since No. 9 (C-9) antibody could not neutralize the toxicity, G_{T1b} was thought to be not the primary receptor for toxin.

The inhibition of binding of the toxin and alkaline phosphatase-labeled No. 9 (C-9) antibody and/or No. 12 (CA-12) antibody was examined in the presence of each of four unlabeled monoclonal antibodies, No. 9 (C-9), No. 12 (CA-12), No. 14 (C-14) and No. 17 (C-17). The reaction between toxin and alkaline phosphatase-labeled No. 9 (C-9) antibody was inhibited completely by unlabeled No. 9 antibody and partially by unlabeled No. 12 antibody, but not by the other two antibodies. On the other hand, the reaction between toxin and alkaline phosphatase-labeled No. 12 (CA-12) antibody was inhibited by unlabeled No. 12 antibody, but not by the other three kinds of antibodies. Antigenic sites of two monoclonal antibodies may be partially overlapping, and the overlapping area seems to be essential to the reaction between toxin and No. 9 (C-9) antibody.

The toxin was digested partially by trypsin, and the fragment having molecular weight of 40000 was obtained (H_6 -fragment). H_6 -fragment showed broad band on polyacrylamide gel electrophoresis, however, the fragment was homogene-

ous antigenically on agar double gel diffusion test. Therefore, H_6 -fragment was thought to be originated from the distinct portion of the heavy chain, eventhough the fragment had varieties of amino acid sequence in terminal position. H_6 -fragment reacted with eight monoclonal antibodies including No. 9 and No. 12 among ten kinds of those which reacted with heavy chain. The fragment bound to neither synaptosomes nor G_{T1b} , although the fragment reacted with No. 9 (C-9) and No. 12 (CA-12) antibodies. This result suggests that the antigenicity of the heavy chain is preserved, but that the structure concerning binding to toxin receptor on the synaptosomal membrane and G_{T1b} is unfolded by tyrrpsinization.