

# Structural and Mutational Analyses of the Receptor Binding Domain of a D/C mosaic toxin from *Clostridium botulinum* strain OFD05

(*Clostridium botulinum* OFD05株由来D/Cモザイク型毒素の受容体結合ドメインの構造機能解析)

## 学位論文内容の要旨

Botulism is a life-threatening disease, in which flaccid paralysis occurs, affecting both human and animals. Botulism is caused by botulinum neurotoxin (BoNTs) which is considered to be the most hazardous biological toxin. There is no specific treatment or effective vaccination for botulism. From recent outbreak (during 2004 – 2007) of cattle botulism in Japan resulting in more than 300 deaths, *Clostridium botulinum* strain OFD05 was identified as major causative agent. Assessment of toxicity from OFD05 in experimental mice showed that it has the highest toxicity ( $1.1 \times 10^9$  ip LD<sub>50</sub>/mg protein) among BoNTs. The results of gene analysis showed that BoNT expressed from OFD05 is a D/C mosaic type, which is composed of the catalytic domain and the receptor-binding domain similar to type D and C BoNT, respectively. BoNT is synthesized as a single polypeptide chain with a molecular mass of 150 kDa. The inactive precursor protein is cleaved into a 50-kDa light chain (LC) and a 100 kDa heavy chain (HC) linked by a disulfide bridge. Structurally, the activated toxin consists of three modules, 50 kDa for each domain. The LC domain possessing Zn<sup>2+</sup> dependent metalloprotease activity and the HC that encompasses the N-terminal 50 kDa translocation domain (H<sub>N</sub>), and C-terminal 50 kDa receptor-binding domain (H<sub>C</sub>). The H<sub>C</sub> can be further divided into two subdomains: a 25 kDa N-terminal subdomain (H<sub>CN</sub>) and a 25 kDa C-terminal subdomain (H<sub>CC</sub>). Each domain is responsible for successful intoxication of presynaptic neurons

resulting in acetylcholine inhibition. The binding step is considered the first and crucial step for intoxication process. BoNTs utilizes the Hc domain to bind to gangliosides and specific protein receptors at presynaptic neurons. In the previous biochemical analysis, it was revealed that BoNT from OFD05 can bind with various gangliosides. In this study, we revealed the ganglioside recognition mechanism of Hc of OFD05 from structural viewpoints.

Firstly, we determined the crystal structure of OFD05Hc by SAD method at the resolution of 3.1 Å. However, the complete model could not be constructed due to the ambiguous electron density of the H<sub>CN</sub> subdomain. Therefore, we determined the crystal structure of H<sub>CN</sub> and H<sub>CC</sub> at resolutions of 1.9 and 1.85 Å, respectively, and constructed the structure model of Hc by superposing the subdomain structures onto the partial structure of OFD05Hc. Structure comparison with other BoNTs assigned three regions located at H<sub>CC</sub> important for receptor binding; 1) the ganglioside-binding site (GBS), 2) the ganglioside-binding loop (GBL) and 3) the protein-binding site (PBS). We then prepared crystals of OFD05Hc in the presence of 3'-sialyllactose, which is a soluble fraction of ganglioside, and determined the structure at a resolution of 3.0 Å. A substantial electron density was observed at the center of the GBS, although it was not clear to construct the model of the bound 3'-sialyllactose. This suggests that the GBS was used for ganglioside recognition. To evaluate the contribution of each region to the ganglioside recognition, 24 alanine-substituted mutants around these regions were prepared, and the ganglioside binding activity was analyzed by surface plasmon resonance (SPR) and P19 cell binding assay. The results of SPR showed that the GBL as well as the GBS strongly contribute to gangliosides recognition. The result of cell binding assay also revealed the significance of these regions on the cell binding. On the contrary, substitution of the residues located in the PBS did not show significant decreasing in the activity. Based on these results, we proposed a receptor binding mechanism of BoNT from OFD05 in which two gangliosides binding sites (GBS and GBL) cooperatively contribute.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	田中	勲
副査	教授	綾部	時芳
副査	准教授	姚	関
副査	特任助教	田中	良和

## 学位論文題名

### Structural and Mutational Analyses of the Receptor Binding Domain of a D/C mosaic toxin from *Clostridium botulinum* strain OFD05

(*Clostridium botulinum* OFD05株由来D/Cモザイク型毒素の受容体結合ドメインの構造機能解析)

ボツリヌス中毒は、人間と動物の両方に影響を及ぼす中毒であり、弛緩性麻痺によって死に至る。ボツリヌス中毒は、最も危険な生物毒素であると考えられているボツリヌス神経毒素 (BoNT) によって引き起こされる。ボツリヌス中毒に特異的な治療法や効果的なワクチンはない。日本における牛ボツリヌス症の最近の流行 (2004 年-2007 年) では、300 頭以上の死亡が確認され、その主要な原因菌として *Clostridium botulinum* OFD05 が同定された。実験用マウスを使った毒性評価によると、OFD05 は、BoNT の中でも特に高い毒性を示した。遺伝子解析によると、OFD05 の BoNT はタイプCに似た触媒ドメインとタイプDに似た受容体結合ドメインで構成されており、D/Cモザイク型である。

BoNT は、150kDa の分子量を有する単一のポリペプチド鎖として合成される。この不活性な前駆体蛋白質は 50 kDa の軽鎖 (LC) とジスルフィド架橋によってつながった 100 kDa の重鎖 (HC) に切断される。構造的には、HC はさらに 2つの部分に分けられ、したがって、活性毒素は、50kDa の 3つのモジュールから構成される。これらは、 $Zn^{2+}$  依存性のメタロプロテアーゼ活性を持つ LC、HC の N 末の 50kDa のトランスロケーションドメイン ( $H_N$ )、および C 末 50 kDa の受容体結合ドメイン ( $H_C$ ) の 3つである。 $H_C$  はさらに二つのサブドメインに分割することができる。約 25kDa の N 末サブドメイン ( $H_{CN}$ ) と 25 kDa の C 末サブドメイン ( $H_{CC}$ ) である。これらの各ドメインは、アセチルコリンの阻害をもたらすシナプス前ニューロンの麻痺に関わっている。毒素の結合は、中毒の最初の重要な段階である。BoNT は  $H_C$  ドメインを利用して、シナプス前神経細胞のガングリオシド、および特異的なタンパク質の受容体に結合する。これまでの生化学的な実験により、OFD05 の BoNT は、様々なガングリオシドと結合できることが明らかにされている。本研究では、構造的に OFD05 の  $H_C$  のガングリオシドの認識機構を明らかにし

た。

実験では、最初に OFD05H<sub>C</sub> の結晶構造を 3.1 Å の分解能で SAD 法により決定した。しかし、H<sub>CN</sub> サブドメインのあいまいな電子密度のためにモデルは完全には構築できなかった。したがって、次に、H<sub>CN</sub> と H<sub>CC</sub> の結晶構造を、それぞれ、1.9, 1.85 Å の解像度で決定し、そして OFD05H<sub>C</sub> の部分構造にサブドメイン構造を重ね合わせることでより HC の構造モデルを構築した。他の BoNT と構造との比較により、受容体結合のために重要な 3 つの領域を H<sub>CC</sub> に割り当てた。それらは、1) ガングリオシド結合部位 (GBS), 2) ガングリオシド結合ループ (GBL), 3) タンパク質結合部位 (PBS) である。次に、ガングリオシドの可溶性画分である 3'-シアリルラクトースの存在下で OFD05H<sub>C</sub> の結晶を用意し、3.0 Å の分解能で構造を決定した。モデルを構築できるほど明確なものではなかったが、結合した 3'-シアリルラクトースに相当するかなり大きな電子密度が GBS の中心に観察された。これは、GBS がガングリオシドの認識に使われていることを示唆している。

ガングリオシドの認識に対する各領域の貢献度を評価するために、これらの領域の約 24 カ所のアラニン置換変異体を調製し、ガングリオシド結合活性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) と P19 細胞結合アッセイにより解析した。SPR の結果は、GBL と GBS がガングリオシドの認識に強く寄与していることを示した。細胞結合アッセイの結果は、また、細胞結合に関するこれらの領域の重要性を明らかにした。逆に、PBS に位置する残基の置換では、活性の有意な減少は認められなかった。これらの結果に基づいて、2 つのガングリオシド結合部位 (GBS と GBL) が協力して寄与する OFD05 の BoNT の受容体結合メカニズムを提案した。

以上、本研究では、X 線結晶構造解析によりボツリヌス毒素 OFD05 の構造を決定し、構造にもとづいたアミノ酸置換により、受容体結合メカニズムを解明した。本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認めた。