

ボツリヌス毒素複合体の構造と機能

大 山 徹*

(平成 24 年 12 月 3 日受付/平成 24 年 12 月 7 日受理)

要約: ボツリヌス神経毒素 (BoNT) は、自然界最強の毒素であり、コリン作動性シナプスからの神経伝達物質放出の阻害によって、ヒトや動物のボツリヌス症として知られる致死的な疾病を引き起こす。ボツリヌス菌株は、BoNT の抗原性の違いにより、A から G 型の血清型に分類され、A, B, E および F 型はヒトに対して、一方 C および D 型は動物や鳥類のボツリヌス症の原因物質とされている。全ての血清型の BoNT には各々の無毒成分タンパク質が非共有結合的に会合して大きな毒素複合体 (TC) を形成する。培養液中では、BoNT と非毒非血球凝集素 (NTNHA) の複合体 (M-TC) とさらに M-TC に 3 種の血球凝集素 (HA: HA-70, HA-33 および HA-17) が会合したより大きな複合体 (L-TC) が存在する。これらの TC には、構成成分のいくつかには特定の部位には分子内切断 (nick) があるため、SDS-PAGE 上で多数のバンドが出現する。C および D 型のボツリヌス菌株から毒素の精製中に著者らは偶然にも無傷の TC 種を産生する特異的な D 型菌 4947 株 (D-4947) を見出した。

本論文では、主に特異的な D-4947 の TC に関する主要な知見が述べられている。(1) C および D 型 TC 構成成分 (BoNT, NTNHA および HA-70) における菌体プロテアーゼあるいは自発的切断によるニック部位が特定された。(2) 分離精製した各 TC 構成成分による L-TC の再構成に成功し、その形成機構を明らかにし、各構成成分遺伝子の発現が調べられた。(3) 各種培養細胞系を用いて、C および D 型 L-TC の HA-33 が小腸上皮細胞透過において本質的な役割を果たしていた。(4) 電顕観察および HA-33/HA-17 複合体の X 線結晶解析により、個々のサブユニットが会合する経路と 14 量体からなる L-TC 各サブユニットの立体的配置を初めて提唱した。(5) 消化酵素耐性実験から、NTNHA が BoNT を消化から保護している決定的な証拠を提供した。また、NTNHA 分子は 1 個の亜鉛分子を含み、BoNT との構造的類似性が認められ、X 線小角散乱分析から NTNHA の水溶液中での動的構造の性質が示された。

キーワード: ボツリヌス毒素, 毒素複合体, X 線結晶解析, 血球凝集素, 無毒成分タンパク

1. はじめに

ボツリヌス毒素 (BoNT) は、グラム陽性・偏性嫌気性 Clostridium 属に分類されるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) が産生する最強の神経毒素である。その毒性は、1g で 100 万人以上を死なせることができるとされ、動物実験から、ヒトにおけるボツリヌス A 型毒素の致死量は、経口摂取で 70 μ g、静脈注射で 0.1 μ g と推測されている。わが国では、調査が始まった戦後から現在までに 500 名を上回る患者が認められ、発生地のはほとんどは北海道、東北に集中し、イヅシ、キリコミが原因食品であったが、近年の輸入食品 (あるいは原材料) によるものも多く見られるようになってきている。治療法は毒素を中和する抗血清の投与のみと言われている。

ボツリヌス菌は、栄養や温度条件が悪化した時に栄養型 (増殖型) 菌体から変化し、耐久型の芽胞を菌体内に形成する (図 1)。芽胞は外殻に包み込まれ、熱など物理的・化学的条件に強い抵抗性を示す。このことはボツリヌス菌が食中毒の原因菌であることを考慮すると非常に重要であり、食品などを嫌気的条件下に置くことの多いいづしや瓶

詰め、および真空パック入り食品での食中毒が起きていることを考えると容易に理解出来る。芽胞が付着した死んだ動物・魚、缶詰、ソーセージ (ラテン語で botulus と言い、菌名の由来である) などの嫌気的条件下で発芽し、栄養細胞となって増殖して毒素を産生する。

この毒素の本体は、分子量約 150 kDa のタンパク質で、その抗原性の違いにより、A~G 型の 7 種の血清型に分類される。ボツリヌス菌は、土壌細菌の一つで、わが国の各地で調べられた土壌中からも見出されており、A, B 型菌は南極大陸を除く世界中の土壌から分離されるが、わが国では認められず、主として E 型菌が広く分布していることが知られている。A~G 型のうち、ヒトに病原性を示すのは A, B, E および F 型であり、一方、C と D 型は、家畜、鳥類、齧歯類に感受性が知られており、これまでヒトにおける中毒事例は報告されていない。

いずれの型の BoNT は、汚染された食品中や菌体培養液の上清中では、単独では存在せず、一連の無毒成分タンパク質と結合して複合体を形成している。無毒成分は、経口的に吸収された BoNT が、胃の酸性 (pH 2) や小腸での種々の消化液が存在するタンパク質にとって厳しい環境

* 東京農大学生物産業学部食品香粧学科 (現: 北海道文教大学人間科学部健康栄養学科)

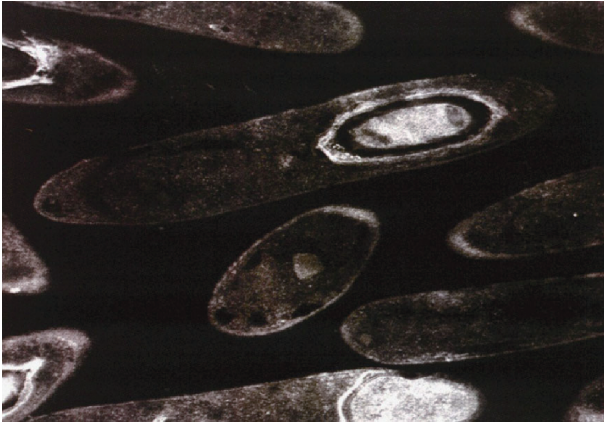


図1 増殖静止期におけるボツリヌス菌の顕微鏡写真。菌体内部に芽胞が形成しているのが観察される。(北海道立衛生研究所提供)

において破壊されることから保護し、標的細胞まで無事に送達する運搬容器の役割を担っていると考えられる(図2)。自然毒の中で、このような送達システムを持っているのは、ボツリヌス毒素だけであり、BoNTの詳細な構造と作用機構は1990年代に明らかにされた。一方、毒素複合体のサブユニット構造の詳細は長期間不明であったが、2012年までに、サブユニットを構成する全てのタンパク成分のX線結晶解析による立体構造解析が明らかにされた。本稿では、この特異的なBoNT・無毒成分タンパク複合体に焦点を当て、その構造と機能について解説し、ついで著者らの研究室で得られた研究結果からボツリヌスD型毒素複合体の構造を中心に説明する。

2. ボツリヌス神経毒素と毒素複合体

1946年、LAMANNA¹⁾は、A型菌の培養液からマウスに対する毒性が並外れて高く、BoNTの本体と考えられた分子量900kDaのタンパク質を結晶標品として得ることに成功した。その後、ボツリヌス菌の培養液から分子サイズの異なる毒素タンパク質が次々と分離された。1968年、DASGUPTA²⁾は、A型毒素をアルカリ条件下でカラムクロマトを行うと、毒素活性を持つ分子量150kDaのタンパク質と無毒タンパク質に分離した。同様な方法で、各血清型のボツリヌス菌の培養液から、150kDaの毒素タンパク質が次々と分離され、このタンパク質がボツリヌス毒素の本体とされ、神経毒素(BoNT)と呼ばれるようになった。

1970年代、SUGIとSAKAGUCHI³⁾は、A~F型菌の毒素には、900kDa、500kDaおよび300kDaと分子サイズの異なる毒素タンパク質が存在し、培養液中でBoNTは単独では存在しないことを報告した。これらの毒素は、BoNT、130kDaの非毒非血球凝集素(non-toxic nonhemagglutinin, NTNHA)および3種類の血球凝集素成分(hemagglutinin, HA; 70kDaのHA-70、33kDaのHA-33および17kDaのHA-17)から構成される複合体で、分子サイズは無毒タンパク質の構成比が異なるとした。さらに、BoNTのみを胃液と混合すると、その毒素活性は速やかに失われ、一方、複合体を同様に処理してもその毒性は、依然として保持されていた。このことから、

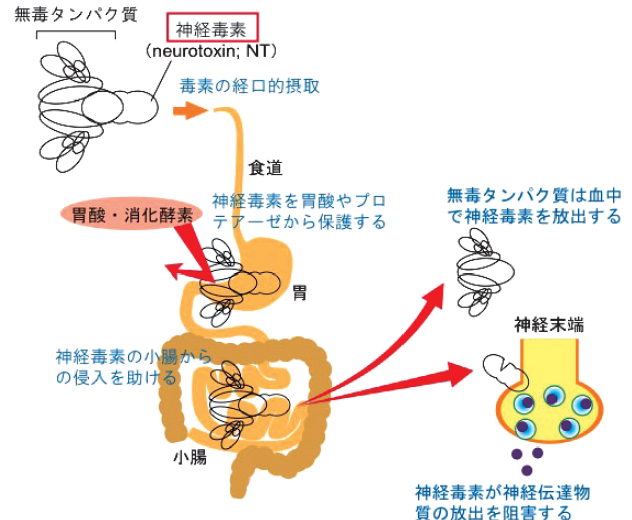


図2 毒素型食中毒を引き起こすボツリヌス毒素の経路
食品などで芽胞が発芽し、増殖、毒素の産生が起こり、経口的に摂取された毒素は、胃・腸を経由して血流に入り、最終的に末梢神経の神経・筋接合部に到達する。また、乳児の腸管内で増殖、毒素の産生が起こる乳児ボツリヌス症もある。

BoNTは経口毒素としてのボツリヌス毒素の本体とは言えず、複合体こそが真の本体であると考えた。

3. ボツリヌス神経毒素の構造と作用機序

BoNTは、一本のポリペプチドとして合成されるが、菌体由来のプロテアーゼによって分子内に切断(nick)が生じ、ジスルフィド結合によって連結した軽鎖(50kDa)と重鎖(100kDa)の二本鎖構造となる。このnickが生じることによって、毒性が数百倍上昇することから、二本鎖構造がBoNTの毒性発現に重要な役割を果たすことが明らかにされた⁴⁾。BoNTのnick部位は、ジスルフィド結合によって軽鎖と重鎖の間に生じるループ状の領域にあることが知られていた。ループ領域は型によってアミノ酸数は異なっており、最も少ないB型で8残基、最も長いのはA型の23残基である。いずれもArgおよびLysのカルボキシル側で切断されると考えられた。SAGANE⁵⁾は、CおよびD型の切断部位が2箇所存在することを見出し、BoNTタンパク表面におけるアミノ酸の表面露出程度から他の血清型についても複数の切断部位を推定した。また、SUZUKI⁶⁾はループ領域以外の重鎖のC末端側にニックが生じると毒性が大きく減少することを示した。これらのnickに関わる菌体内のプロテアーゼに関して、SUZUKI⁷⁾は、C型菌から41kDaと17kDaタンパク質が非共有結合的に保持された二量体酵素である特異的プロテアーゼを分離精製した。さらにmodelingとdocking simulationにより、プロテアーゼの活性中心とループ領域がうまく適合していることを示した。

遺伝子の塩基配列から全ての血清型BoNTのアミノ酸配列が明らかになり、全ての血清型BoNTの軽鎖中に金属依存性プロテアーゼのZn結合モチーフである“HEXXH”配列が見出された。精製BoNTをキレート剤で

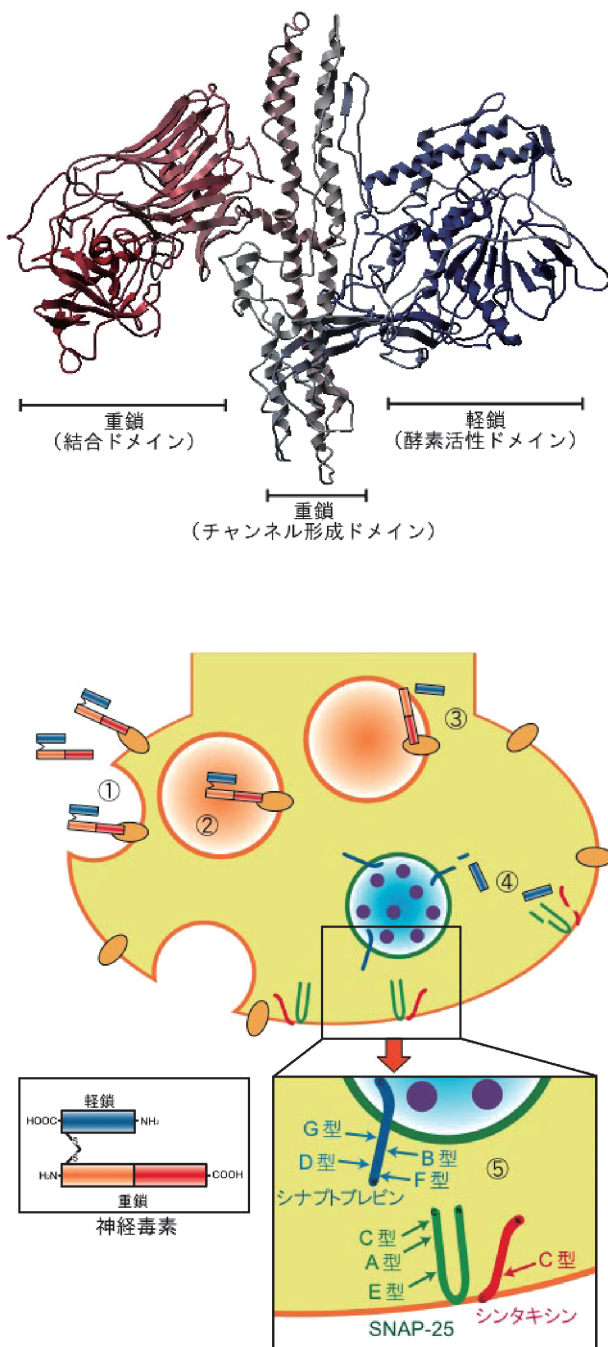


図3 ボツリヌス神経毒素の構造と発症機構
 神経毒素は三つの機能的ドメインに分けられ、軽鎖は酵素活性（毒性）ドメイン、重鎖のN末端側はチャンネル形成ドメイン、重鎖C末端側は結合ドメインと呼ばれる。神経・筋接合部に到達した神経毒素は、①結合ドメインがシナプス前膜の受容体に特異的に結合する。②受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、エンドソームに取り込まれる。③酸性の環境下で、毒素はチャンネル形成ドメインによってエンドソーム膜に孔を形成する。同時に毒素は、細胞質へと移行する。④ジスルフィド結合が還元され、軽鎖のエンドペプチダーゼがSNAREタンパク質群を特異的に切断する。⑤B, D, F, G型はシナプトプレビン、C型はシンタキシン、A, C, E型はSNAP-25を切断し、神経伝達物質の放出を阻害する。

処理すると、その毒性が失われることから、長い間不明であったボツリヌス毒素の本体がZn依存性エンドプロテアーゼによるものであることが明らかにされた。その後、神経・筋接合部における毒性発現のメカニズムが、現在までにはほぼ明らかになった^{8,9)}。

図3に示すようにBoNTは、機能的に三つの独立したドメインから構成されており、毒性発現に各々は役割を持っている。神経・筋接合部でBoNT重鎖のC末端側の結合ドメインが、神経細胞膜上の受容体への特異的結合によって最初のステップが始まる。その後、受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、BoNTは、被膜小胞、エンドソームに取り込まれる。この時、BoNTのジスルフィド結合が還元され、軽鎖は重鎖から離れ、酸性環境下で、毒素は受容体から解離するとともに、BoNTの立体構造変化が起こり、重鎖のN末端側チャンネル形成ドメインによってエンドソーム膜に孔が形成され、軽鎖は細胞質へと移行する。軽鎖は、シナプス小胞（アセチルコリン小胞）がシナプス前膜へドッキングし、融合するために必要なSNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor) タンパク質群を特異的に切断する。血清型により、シナプトプレビン、シンタキシン、SNAP-25のいずれかを切断し、結果として神経伝達物質の放出を阻害して死に至る神経麻痺をもたらす。この一連の過程がボツリヌス中毒症として説明されている。

ヒトにおける中毒症状は、神経・筋伝達系の阻害作用のため、複視などの視力障害、眼瞼下垂、発語障害、嚥下障害など特に神経系の神経（筋）マヒ症状が出現する。しかし、中枢神経への作用はなく、食中毒の一つでありながら下痢、腹痛などの消化器症状を欠いている。

4. ボツリヌス毒素複合体の遺伝子構成とタンパク質構成

1990年、ボツリヌスA型BoNT遺伝子の全塩基配列が決定¹⁰⁾されて以来、2年間に全血清型のBoNTの全塩基配列が決定された。その後、毒素複合体を構成する無毒成分タンパク質の遺伝子も同様に、全塩基配列が決定された。筆者らも、D型毒素複合体のBoNTを含む全構成成分タンパク質遺伝子の塩基配列決定に関わった^{11, 12)}。血清型により5個(BoNT, NTNHA, 3種のHA)、あるいは2個(BoNT, NTNHA)の構造遺伝子からなっており、各々の遺伝子の間には短い介在配列と毒素遺伝子群の発現調節遺伝子が1個存在する。これらの毒素遺伝子は、細菌ゲノム(A, B, E, F型)、ファージDNA(C, D型)あるいはプラスミド(G型)の上に遺伝子クラスターを形成している。遺伝子から推測された毒素複合体成分のアミノ酸配列の相同性は、各血清型間でBoNTは32~60%、NTNHAは56~100%、HA-70は68~99%、HA-33は35~100%、HA-17は51~100%であった。無毒成分タンパク質に関して言えば、CとD型の間では、100%近い相同性を示している。

ボツリヌス菌株は血清型により、異なった分子構造を示す毒素複合体(TC)を培養液中に産生する。毒素複合体には、BoNTとNTNHAが結合した300kDaのM-TC(A~F型)、

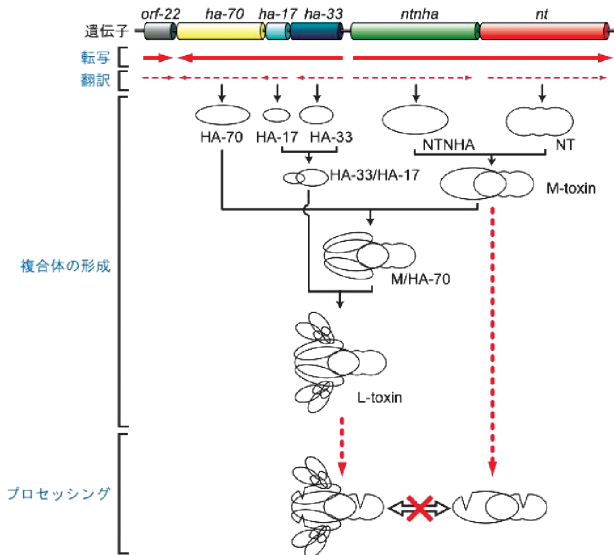


図4 D-4947毒素遺伝子の発現から複合体への形成経路
神経毒素 (*nt*)、非毒非血球凝集素 (*ntnha*)、血球凝集素 (*ha-33*, *ha-17*, *ha-70*)、*p-21* (*orf-22*) の各遺伝子の構成と転写方向を示し、それらの intact な遺伝子産物が集合して複合体が経路する順序を各々矢印で示す。プロテアーゼによるプロセッシングを受けた場合の経路も示した。

M-TCにさらに3種のHA成分 (HA-70, HA-33およびHA-17) が会合した650kDaのL-TC (A~DおよびG型)、さらにL-TCが2分子重合したと考えられるLL-TC (A型) の3種類がある。しかし、なぜL-TC, M-TCなどの複合体が同時に培養液中に存在しているのかは不明であった。全ての毒素構成成分タンパク質は、翻訳後に各々が自発的に集合して複合体を形成する。OHYAMAら¹²は、D型CB16株由来M-TCのNTNHAのN末端から15kDa付近領域に、nickが生じており、L-TCのそれには認められないことを見出した。また、SAGANEら¹³は、そのnickがNTNHAの保存中に自発的な自己触媒的に生じること、プロテアーゼによっても加速することを明らかにした。ところが、KOGUCHIら¹⁴は、形成途中でNTNHAのN末端側領域15kDa付近にnickが生じると、BoNTとM-TCは形成出来るが、HA成分はもはや結合出来ず、L-toxinは形成しないことを証明して、L-TC, M-TCが同時に培養液中に存在することを説明した。EとF型のNTNHAには、このnick領域の部分が欠失しており、毒素複合体は、M-TCのみが産生される。G型はこの領域の配列が異なり、nickを受けないのでL-TCのみが形成する。従ってA~D型は、NTNHAがnickを受けた時、M-TCとなり、nickをまぬがれるとL-TCに成熟する。

HA-70も菌体由来のプロテアーゼによってnickが生じ、N末端側から22~23kDa付近に複数のnickを受け¹⁵、22~23kDaおよび55kDaのフラグメントに分かれる。これにより、通常のL-TCはSDS-PAGE上で7本以上のバンド(大きい順に、NTNHA, BoNT重鎖, HA-55, BoNT軽鎖, HA-33, HA-22~23およびHA-17)が観察される。

5. 血球凝集素 (HA-33) 成分の機能

ボツリヌス毒素L-TCが、神経毒性の他に、HA成分による血球凝集活性を有していることは、古くから知られていた。一般にC, D型HA-33は、N-アセチルムラミン酸あるいはシアール酸糖脂質を介して血球と結合して凝集活性を示し¹⁶、その結合部位の一つがC末端側のドメインに存在している。INOUEら¹⁷は、X線結晶解析によりC型HA-33分子は二つの β -trefoilドメイン (6本の逆平行 β バレル構造の一端が3本の β ヘアピン構造により三つ葉状を形成し、糖鎖結合ドメインとして知られている) が短い α -helixで結ばれた左右対称のダンベル型の立体構造を明らかにした。

ボツリヌス毒素は分子量の大きいほど、強い経口毒性を示すことが知られているが、HA成分の重要な機能に関しては多数の報告がある。FUJINAGAら¹⁸は、モルモットの腸管を用いた実験から、C型L-TCは、小腸上部の微絨毛にシアール酸を介してHA成分 (おそらくHA-33) が結合し、BoNTが血中に取り込まれ易くなっていることを報告した。KOGUCHIら¹⁹は、ウマ赤血球に対する結合実験から、CあるいはD型L-TCのHA-33が結合に関与していることを見出した。また、NIWAら^{20, 21}はD型毒素複合体を用いてCaco-2細胞およびラット小腸上皮培養細胞 (IEC-6) の各々に結合すること、そしてYONEYAMAら²²はウシ血管上皮培養細胞を用い、D型毒素でも同様な結果を報告した。さらにINUIら²³もC型毒素のIEC-6細胞に対する結合がシアール酸の関与を明らかにした。また、ITO²⁴らは、HA-33の数が異なるD型毒素複合体種を用いてIEC-6細胞への結合がHA-33の数に依存していることを報告した。これらのことから、CおよびD型ボツリヌス毒素の標的細胞への結合には細胞表面のシアール酸と毒素構成成分のHA-33が関与していることを強く示唆した。

以前に、OGUMAら²⁵は、D型1873株の培養液が血球凝集活性を殆ど示さず、また、NAKAJIMAら²⁶は、D型1873株からの精製L-TCが血球凝集活性を殆ど示さないことを見出していた。同時に、SAGANEら²⁷は、HA-33のC末端側から31アミノ酸残基が欠失したC型変異株 (C-Yoichi) も血球凝集活性も血球結合活性を示さないことを報告した。C型HA-33を鋳型にして、C-YoichiのHA-33のモデルリングを試みたところ、C末端側のアミノ酸の欠落によって β -trefoil構造が破壊され、分子の対称性が失われることにより、糖鎖結合活性が消失することを示した。しかしながら、MATSUOら²⁸は、C-YoichiのL-TCあるいは分離したHA-33/HA-17が、糖鎖分解酵素 (Neuraminidase) で処理した血球に対して、劇的に凝集活性および結合活性が劇的に上昇することを見出した。しかもこの活性はガラクトースあるいはラクトースによって完全に阻害され、他のC型菌株由来のHA-33とは明らかに異なり、B型のL-TCと類似の活性²⁹を示した。これらをまとめると、各血清型のボツリヌス毒素は、菌株によっても糖鎖認識に多様性が存在し、動物やヒトに対する経口毒性はガラクトースやシアール酸を介して腸管の標的細胞に結合して発現すると考えられる。

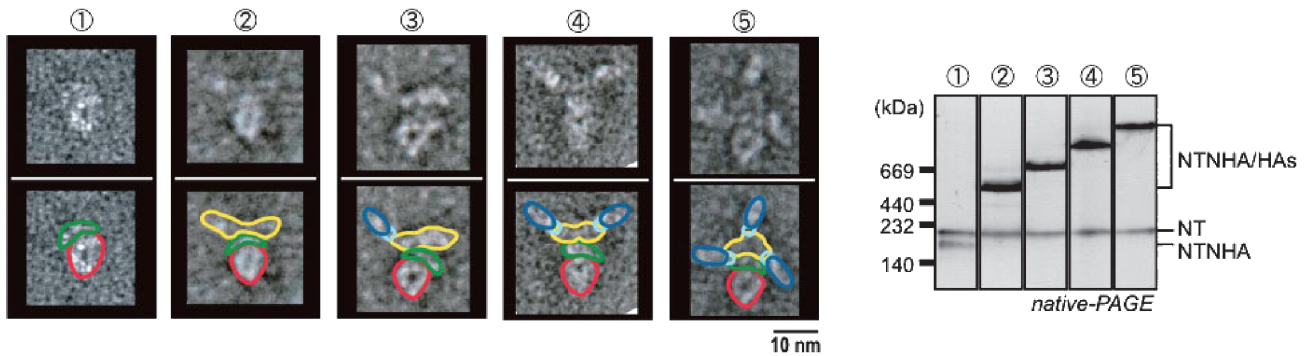


図 5 D-4947 毒素複合体形成の電子顕微鏡写真と Native-PAGE 分析

M-toxin から L-toxin へと順次形成する経路に従って、左から① M-toxin (神経毒素と NTNHA の complex), ② M-toxin に HA-70 が結合した complex, ③ さらに 1 分子の HA-33/HA-17 が結合, ④ さらに 2 分子の HA-33/HA-17 が結合, ⑤ 3 分子の HA-33/HA-17 で飽和した成熟 L-toxin を示す。下段に各サブユニットの外殻をトレースしたものを示す。右図に①～⑤の Native-PAGE のパターンを示す。pH 8.0 の条件下のため、神経毒素と無毒成分は分離している。

6. D 型 4947 株のボツリヌス毒素複合体の分子構造

前述したように、BoNT を含めて殆どの血清型菌株由来の毒素複合体の構成成分は、菌体由来のプロテアーゼによる分子内 nicking などの翻訳後修飾を受ける。しかし、このことによって、SDS-PAGE 上で 7 本以上のバンドが観察され、複合体成分タンパク質の構造解析は複雑となっていた。筆者らは、C および D 型の菌株の中に、その構成成分のいずれにも nick を認めない無傷の毒素複合体を大量に産生する特異的な D 型菌 4947 株 (D-4947) を見出し、HASEGAWA ら³⁰⁾ は、L-TC の精製と BoNT の分離法を確立し、さらに Miyata ら³¹⁾ は抗体沈降法により高度に精製された BoNT を全く含まない無毒成分タンパクの調製法を確立した。これにより、5 種の無傷の構成成分を取り扱うことが出来、複合体の解析が格段に容易になった。さらに、無傷の D-4947 L-TC をトリプシン処理により、任意に nick 型の成熟毒素複合体を作成することができ、nicking による毒素複合体の構造変化、毒性発現・活性化の機構を考察することが可能となった。

KOUGUCHI ら¹⁴⁾ は、D-4947 毒素複合体から各構成成分タンパク質の分離と再構成に初めて成功し、ボツリヌス毒素複合体の形成過程を明らかにした。図 4 に示すように、最初に BoNT と NTNHA が結合した M-TC が形成する。この時、NTNHA に nick が生じていると、M-toxin にとどまる。無傷の M-TC に HA-70 が結合し、さらに HA-17 を介して HA-33 が結合して L-TC (分子量約 650 kDa) が完成する。他の血清型の毒素複合体も同様な過程を経て完成すると考えられる。

さらに、MUTOH ら³²⁾ は、D-4947 毒素複合体の精製中に、HA-33/HA-17 の結合数が異なる毒素複合体種 (L-TC より HA-33/HA-17 が 2 分子、1 分子少ない) を見出した。これらの複合体種に HA-33/HA-17 を滴定し、650 kDa L-TC への変換を観察して、ボツリヌス毒素複合体は 1 分子の BoNT, 1 分子の NTNHA, 2 分子の HA-70, 4 分子の HA-33 および 4 分子の HA-17 から構成される 12 量体と推

測した。さらに血球を凝集させるためには、C および D 型の HA-33 が 4 分子必要であることを明らかにした³³⁾。

これまでの報告によれば、複合体構成成分遺伝子の発現は必ずしも一様ではない。KOUGUCHI ら³⁴⁾ は、D 型 4947 株 (D-4947) 毒素複合体の構成遺伝子の mRNA を定量し、BoNT 遺伝子と NTNHA 遺伝子の発現レベルは 1 : 1 であり、一方、HA-33 遺伝子が他の二つの HA 遺伝子よりも低いレベルにあることを示した。このことは、培養液中に HA-33/HA-17 の分子数の少ない D-4947 毒素複合体が存在することと一致する。

さらに、SUZUKI ら³⁵⁾ は、分離した各構成成分とそれらを組み合わせた各種再構成複合体の各々の限定的トリプシン処理に対する感受性の実験から、D-4947 毒素複合体における各サブユニットの相対的配置を推定した。すなわち、BoNT は、軽鎖と重鎖に分ける nick 部位および重鎖 C 末端側の nick 部位は NTNHA によって覆われず、M-TC では露出している。HA-70 分子が結合すると重鎖 C 末端での nick は生じなかった。この時、HA-70 分子には、N 末端側から約 22 kDa 付近に nick が入るが、HA-70 分子の大部分は NTNHA によって覆われている。興味深いことに、分離された HA-70 分子は、トリプシン処理によって細かく切断されるが、M-TC と complex を形成すると最小限の nick にとどまる。HA-70/HA-33/HA-17 の complex をトリプシン処理すると、HA-33 と HA-17 は全く感受性を示さないが、HA-70 分子は、HA-33/HA-17 分子の結合領域を残して細かく切断される。また、複合体の表面を占めていると考えられる HA-33/HA-17 分子は、非常に強いトリプシン耐性を示し、ボツリヌス毒素複合体が胃や腸の消化液に対して耐性を示すことと一致する。

7. ボツリヌス D 型 4947 毒素複合体のサブユニット構成比と立体配置

これまでに、ボツリヌス毒素複合体の 5 種のサブユニットタンパク質の中で、BoNT (A 型、B 型および E 型の 1 部分) および HA-33 (A 型、C 型) が X 線結晶解析によりその立体構造が明らかにされているだけで、NTNHA、

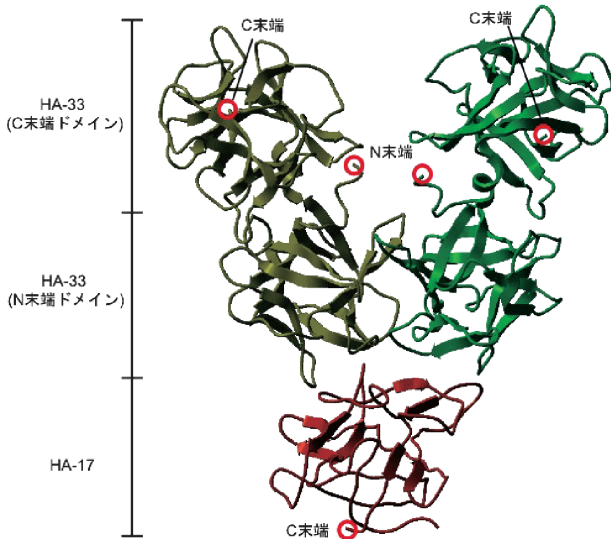


図6 X線結晶解析によるHA-33/HA-17 complexの立体構造
2分子のダンベル型HA-33分子はお互いに左右対称であり、C末端ドメインは上向きにあり、毒素複合体の最も外側に位置している。2分子のHA-33は1分子のHA-17分子に結合している。

HA-70およびHA-17分子については不明である。また、筆者らの毒素複合体サブユニット構造の予測モデル^{32, 33)}を除いて、毒素複合体としての立体構造に関する報告はなかった。

これまで、数千通りの条件下でD-4947の650kDa L-TCの結晶化を試みているが、X線結晶解析に適する結晶は現在まで得られていない。HASEGAWAら³⁶⁾は、ネガティブ染色法によってM-TCからL-TCが形成されるまでの複合体の透過型電子顕微鏡観察を行った。図5に見られるように、BoNTとNTNHAからなるM-TCは丸みを帯びた楕円体であり、これにHA-70分子を結合させると傘状に広がってM-TCを覆っているように見えた。さらにHA-70分子上にHA-33/HA-17分子が順次、一本ずつ突起した腕状に結合していた。この時、HA-70分子にHA-33/HA-17が順次結合ことによって大きな構造変化の様子も観察され、柔軟性の高いunfoldingタンパク質であることが考えられた。最終的に全ての構成成分が集合したこの像は、我々の推測したモデル図と良く一致していたが、しかし、驚いたことに、最終的なL-TCにおけるHA-33/HA-17の“腕”の数は3本であった。当初、HA-33/HA-17が1:1の分子量約50kDaのcomplexとして、“4本腕”を想定していた。電子顕微鏡下では、4本腕L-TCの像は認められなかった。そこで、HA-33/HA-17の分子構成を、超遠心分析、質量分析、アミノ酸分析などで分子量を詳細に分析した結果、いずれもHA-33:HA-17が2:1のcomplexであることを示していた。

さらにHASEGAWAら³⁶⁾は、このHA-33/HA-17 complexのX線結晶解析に成功し、図6に示すように、2分子のHA-33と1分子のHA-17からなる特徴的な構造を明らかにした。これにより、ボツリヌス毒素複合体は、1分子の

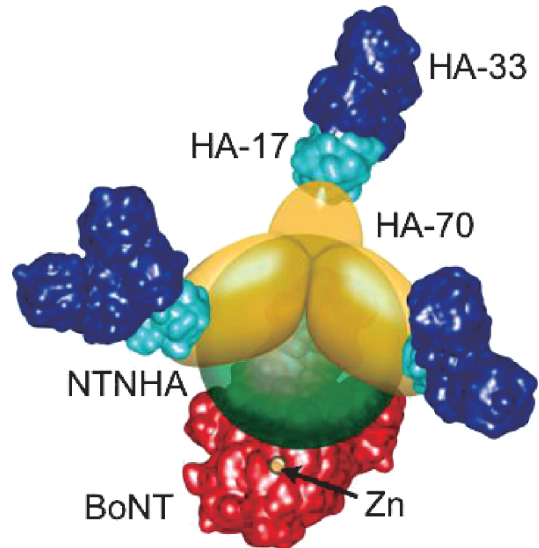


図7 ボツリヌス毒素複合体のモデル図
D-4947毒素複合体(L-toxin)の電子顕微鏡写真を基に推測した14量体モデル(1分子の神経毒素, 1分子のNTNHA, 3分子のHA-70, 3分子のHA-17, 6分子のHA-33)を示す

BoNT, 1分子のNTNHA, 6分子のHA-33, 3分子のHA-17そして恐らく3分子のHA-70からなる14量体サブユニット構造と推測した(図7)。しかしながら、この構造では、HA-70およびNTNHAの立体構造が明らかにされておらず、暫定的なものである。また、3本腕構造のL-TCもその形態は一様ではなく、明らかに構造的柔軟性を持っているようにみえた。それにも拘わらず、このサブユニット構造モデルが“delivery vehicle”としてのボツリヌス毒素複合体の重要な特徴を示しており、即ち、表面に露出したHA-33が小腸上皮細胞膜への結合を經由して神経毒素を血流へと侵入させる一連の過程が説明される。

8. HA-70およびNTNHAの立体構造

これまで、ボツリヌス毒素複合体構成タンパク質のうち、未解明であったHA-70およびNTNHAのX線結晶解析行われ、2012年までにボツリヌスTCの全ての構成成分の三次元構造が決定された。NAKAMURAら³⁷⁾は、C型菌の毒素複合体のHA-70分子の組換え体を作成し、22kDa (HA-22-23)と53kDa (HA-53)からなる複合体のX線結晶解析から立体構造と糖鎖結合の特異性を明らかにした。結晶中で、3分子のHA-70が集合した三葉のプロペラ状の特異な構造を示し、我々が予測した構造と良く一致していた。しかしながら、HA-70と類似するタンパク質構造はデータベースには認められなかった。さらに、HA-53はシアール酸と特に高い糖鎖親和性を有していた。これらの結果は、毒素複合体形成機構および小腸上皮細胞の糖鎖との相互作用を理解するための情報を提供した。

NTNHAに関して、MIYATAら³⁸⁾による組み換え体の大量発現系の構築および、BoNTとの再構成M-TCの安定性の実験が最初の試みであった。そこでは、単体の

NTNHA および BoNT がトリプシンあるいはペプシンによって容易に消化されるが、再構成 M-TC は劇的な消化耐性を示し、経口毒素として NTNHA が決定的な役割を果たしていること報告した。さらに MIYATA ら³⁹⁾ は、組換え D 型 NTNHA の三方晶系の結晶を得ることに成功し、3.9 Å の分解能でもって予備的な X 線結晶解析のための資料に供した。

その間に、GU ら⁴⁰⁾ は初めて A 型 NTNHA の X 線結晶解析により、NTNHA および BoNT との M-TC の立体構造を明らかにした。それによれば、A 型 BoNT との再構成 M-TC は、しっかりとお互いに連結した複合体を形成し、NTNHA が BoNT を保護するための大きなしかも多数の部位で結合する接触面を備えていた。しかも、NTNHA は、BoNT とのアミノ酸配列の相同性が 20% 以下にもかかわらず、その構造は BoNT と驚くほど良く似ており、同様に 3 つのドメインからなっていた。また M-TC が pH に対して応答するアミノ酸残基によってダイナミックに調節されており、酸性条件下で安定な複合体形成によって保護されている BoNT が中性付近の pH で複合体から遊離することを説明した。

BoNT と NTNHA の立体構造が類似しているのにもかかわらず、NTNHA は BoNT の軽鎖に存在するプロテアーゼの Zn 結合部位、HE_{xx}H モチーフを欠いていた。これに対して、INUI ら⁴¹⁾ は、ICP-MS 分析によって、D 型の NTNHA にも 1 分子の Zn を含んでいることを明らかにした。A から F 型の NTNHA 構造相同性比較と homology modeling から、新たに 1 分子の Zn 分子が配位結合する領域の共通配列、K-C-L-I-K-X-D を見出した。このことから BoNT と NTNHA は、恐らく Zn タンパク質を共通の祖先として、その後、各々に異なった機能を持つように進化したと提唱した。ごく最近、SAGANE ら⁴²⁾ は、D 型 4947 株の NTNHA および M-TC の結晶構造解析と X 線小角散乱解析 (SAXA) によって溶液中のそれらの構造を比較した。その結果、SAXA 像は、NTNHA の N 末端側の 2/3 は、結晶も溶液中でも同じ構造であったが、C 末端側 1/3 は溶液中では明らかに異なり、もっと伸びきった構造を示していた。このことは、BoNT との結合に関与する NTNHA の C 末端側ドメインの高度な柔軟性を意味しており、このような動的構造が M-TC 形成を説明する上で重要な知見と考えられる。

9. 結 論

近年、ボツリヌス毒素は、神経毒性発現メカニズムを利用してジストニア症など筋緊張性疾患の治療、美容整形などに応用されている。しかし、ボツリヌス毒素のその自然界最強の毒性とともに、もう一つの際立った特徴は、BoNT と無毒タンパク質との複合体構造にあり、この特異な機能を示す複雑なサブユニット構造の解明は、生物化学上非常に大きな意義がある。2012 年までにボツリヌス毒素を構成する全ての成分タンパク質の結晶構造が明らかにされた。しかしながら、全てのタンパク質分子というものは、基本的に水溶液中で機能を発揮する。水溶液の温度、

イオン強度、pH、さらにはタンパク質自体の濃度などによって、常に動き回り、種々の化学的結合力 (イオン結合、疎水結合など) が複雑に競い合ってその配置が転換する。しかし、結晶構造から提示される分子モデルは、動的なタンパク質を静的なものとして表しており、ボツリヌス毒素のように顕著な特徴の一部は、捉えているものの、一方、無視されている特徴も少なくないと考えらるべきである。

最近の実験によるボツリヌス毒素の水溶液中での X 線小角散乱解析では、もう少し異なったサブユニット数も示唆され、先入観のため、無視されていたが複合体の組み換えも起こっているような現象も見出されていた。今後の課題として、このような複雑で精巧なタンパク質は、生体分子プロセスや物質のコンピューターシミュレーションによってモデル化することで説明されると思われる。一方、ボツリヌス毒素複合体の詳細な構造解明は、医療上有用な機能性物質の経口投与システム (Drug Delivery System; DDS) として、また経口のボツリヌス中毒症に対する予防治療薬デザインに有効であると考えられる。

謝辞: 長きに渡り、共同研究者として多くの論文に多大な寄与し、共に大学院生の論文指導に真摯に携わった渡部俊弘教授に深甚なる感謝の意を表明します。培養細胞系を用いた実験により、多くの院生を指導し、論文作成などにより研究室でのボツリヌス研究に多大な尽力をされた丹羽光一教授に深く感謝を致します。相根義昌博士、孝口裕一博士、武藤信吾博士、長谷川仁子博士、鈴木智典博士、米山徹博士、宮田恵多博士の大学院博士課程に在籍した院生のひたむきな研究と優れた業績無しには、本稿はありません。心よりの敬意を表します。また松尾智仁君、伊藤博章君、犬井 健君を始めとして多くの修士課程の院生、そして同時に、献身的に生物化学研究室を支えた卒論生には、心から厚く感謝感謝を申し上げます。

桃木芳枝教授は常に我々の研究を励まし続けていただき、中川知行准教授、吉川欣亮准教授、富塚 登教授、中川純一教授との学術論文の有意義なディスカッションが出来たこと、学位論文審査などで横濱道成教授、西澤 信教授から寄せられたご厚情に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) LAMANNA C, McELORY O E, EKLUND M E (1946) The purification and crystallization of *Clostridium botulinum* type A toxin. *Science* 103: 613-614.
- 2) DASGUPTA B R, BOROFF D A (1968) Separation of toxin and hemagglutinin from crystalline toxin of *Clostridium botulinum* type A by anion exchange chromatography and determination of their dimensions by gel filtration. *J. Biol. Chem.* 243: 1065-1072.
- 3) SUGI S, SAKAGUCHI G (1975) Molecular construction of *Clostridium botulinum* type A toxins. *Infect. Immun.* 12: 1262-1270.
- 4) SUGIYAMA H (1980) *Clostridium botulinum* neurotoxin. *Microbiol. Rev.* 44: 419-448.
- 5) SAGANE Y, WATANABE T, KOUGUCHI H, SUNAGAWA H, INOUE K, FUJINAGA Y, OGUMA K, OHYAMA T (1999) Dichain structure of botulinum neurotoxin: Identification of

- cleavage sites in types C, D, and F neurotoxin molecules. *J. Protein Chem.* **18** : 885-892.
- 6) SUZUKI T, KOGUCHI H, SATO H, HASEGAWA K, MUTOH S, YONEYAMA T, NIWA K, NISHIKAWA A, LEE C-J, OGUMA K, WATANABE T, and OHYAMA T (2007) Effect of nicking in the C-terminal of heavy chain of *Clostridium botulinum* serotype D neurotoxin on its toxicity and molecular properties. *Protein J.* **26** : 173-181.
 - 7) SUZUKI T, YONEYAMA T, MIYATA K, MIKAMI A, CHIKAI T, KOGUCHI H, INUI K, NIWA K., WATANABE T, MIYAZAKI S, OHYAMA T (2009) Molecular characterization of the protease from *Clostridium botulinum* serotype C responsible for nicking in botulinum neurotoxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379** : 309-313.
 - 8) SCHIAVO G, BENFINATI F, POULAIN B, ROSSETTO O, POLVERINO L P, DASGUPTA B R, MONTECUCCO C (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359** : 832-835.
 - 9) SIMPSON L L (1981) The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol. Rev.* **33** : 155-188.
 - 10) BINZ T, KURAZONO H, WILLE M, FREVERT J, WERNERS K, NIEMAN H (1990) The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **265** : 9153-9158.
 - 11) SUNAGAWA H, OHYAMA T, WATANABE T, INOUE K (1992) The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type D neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding phage d-16 phi genome. *J. Vet. Med. Sci.*, **54** : 905-913.
 - 12) OHYAMA T, WATANABE T, FUJINAGA Y, INOUE K, SUNAGAWA H, FUJII N, INOUE K, OGUMA K (1995) Characterization of nontoxic-nonhemagglutinin component of the two types of progenitor toxin (M and L) produced by *Clostridium botulinum* type D CB-16. *Microbiol. Immunol.* **39** : 457-465.
 - 13) SAGANE Y, WATANABE T, KOGUCHI H, SUNAGAWA H, OBATA S, OGUMA K, OHYAMA T (2002) Spontaneous nicking in nontoxic-nonhemagglutinin component of the *Clostridium botulinum* toxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292** : 434-440.
 - 14) KOGUCHI H, WATANABE T, SAGANE Y, SUNAGAWA H, OHYAMA T (2002) *In Vitro* reconstitution of the *Clostridium botulinum* type D progenitor toxin. *J. Biol. Chem.* **277** : 2650-2656.
 - 15) WATANABE T, SAGANE Y, KOGUCHI H, SUNAGAWA H, INOUE K, FUJINAGA Y, OGUMA K, OHYAMA T (1999) Molecular composition of progenitor toxin produced by *Clostridium botulinum* type C strain 6813. *J. Protein Chem.* **18** : 753-760.
 - 16) INOUE K, FUJINAGA Y, HONKE K, YOKOTA K, IKEDA T, OHYAMA T, TAKESHI K, WATANABE T, INOUE K, OGUMA K (1999) Characterization of haemagglutinin activity of *Clostridium botulinum* type C and D 16S toxins, and one subcomponent of haemagglutinin (HA1). *Microbiology* **145** : 2533-2542.
 - 17) INOUE K, SOBHANY M, TRANSUE T R, OGUMA K, PEDERSEN L C, NEGISHI M (2003) Structural analysis by X-ray crystallography and calorimetry of a haemagglutinin component (HA1) of the progenitor toxin from *Clostridium botulinum*. *Microbiology* **149** : 3361-3370.
 - 18) FUJINAGA Y, INOUE K, WATANABE S, YOKOTA K, HIRAI Y, NAGAMACHI E, OGUMA K (1997) The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology* **143** : 3841-1538.
 - 19) KOGUCHI H, WATANABE T, SAGANE Y, OHYAMA T (2001) Isolation of the components of progenitor toxin produced by *Clostridium botulinum* type C strain Stockholm. *Eur. J. Biochem.* **268** : 4019-4026.
 - 20) NIWA K, KOYAMA K, INOUE S, SUZUKI T, HASEGAWA K, WATANABE T, IKEDA T, OHYAMA T (2007) Role of non-toxic components of serotype D botulinum toxin complex in permeation through Caco-2 cell monolayer, a model for intestinal epithelium. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **49** : 346-352.
 - 21) NIWA K, YONEYAMA T, ITOH H, TAIRA M, CHIKAI T, KOGUCHI H, SUZUKI T, HASEGAWA K, MIYATA K, INUI K, IKEDA T, WATANABE T, OHYAMA T (2010) Sialic acid-dependent binding and transcytosis of serotype D botulinum neurotoxin and toxin complex in rat intestinal epithelial cells. *Vet. Microbiol.* **141** : 312-320.
 - 22) Yoneyama T, Miyata K, Chikai T, Mikami, A, Suzuki T, Hasegawa K, Ikeda T, Watanabe T, Ohyama T, Niwa K (2008) *Clostridium botulinum* serotype D neurotoxin and toxin complex bind to bovine aortic endothelial cells via sialic acid. *FEMS. Immunol. Medical. Microbiol.* **54** : 290-298.
 - 23) INUI K, ITO H, MIYATA K, MATSUI T, HORIUCHI R, IKEDA T, WATANABE T, OHYAMA T, NIWA K (2010) Involvement of sialic acid in transport of serotype C1 botulinum toxins through rat intestinal epithelial cells. *J. Vet. Med. Sci.* **72** : 1251-1255.
 - 24) ITO H, SAGANE Y, MIYATA K, INUI K, MATSUI T, HORIUCHI R, IKEDA T, SUZUKI T, HASEGAWA K, KOGUCHI H, OGUMA K, NIWA K, OHYAMA T, WATANABE T (2011) HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **61** : 323-331.
 - 25) Oguma K, Iida H, Shinozuka M, Inoue K (1976) Antigenicity of converting phages obtained from *Clostridium botulinum* types C and D. *Infect. Immun.* **13** : 855-860.
 - 26) NAKAJIMA H, INOUE K, IKEDA T, FUJINAGA Y, SUNAGAWA H, TAKESHI K, OHYAMA T, WATANABE T, INOUE K, OGUMA K (1998) Molecular composition of the 16S toxin produced by a *Clostridium botulinum* type D strain, 1873. *Microbiol. Immunol.* **42** : 599-605.
 - 27) SAGANE Y, WATANABE T, KOGUCHI H, SUNAGAWA H, OBATA S, OGUMA K, OHYAMA T (2002) Spontaneous nicking in nontoxic-nonhemagglutinin component of the *Clostridium botulinum* toxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292** : 434-440.
 - 28) MATSUI T, MIYATA K, INUI K, ITO H, HORIUCHI R, SUZUKI T, YONEYAMA T, OGUMA K, NIWA K, WATANABE T, OHYAMA T (2011) Characterization of sugar recognition by the toxin complex produced by *Clostridium botulinum* serotype C variant strain Yoichi. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63** : 35-43.
 - 29) ARIMITU H, INOUE K, SAKAGUCHI Y, LEE J, FUJINAGA Y, WATANABE T, OHYAMA T, HIRST R, OGUMA K (2003) Purification of fully activated *Clostridium botulinum* serotype B toxin for treatment of patients with dystonia. *Infect. Immun.* **71** : 1599-1603.
 - 30) HASEGAWA K, WATANABE T, SATO H, SAGANE Y, MUTOH S, SUZUKI T, YAMANO Y, KOGUCHI H, TAKESHI K, KAMAGUCHI

- A, FUJINAGA Y, OGUMA K, and OHYAMA T. (2004) Characterization of toxin complex produced by a unique strain of *Clostridium botulinum* type D 4947. *Protein J.* **23** : 371-378.
- 31) MIYATA K, SAGANE Y, INUI K, MIYASHITA S, SUZUKI T, OGUMA K, OHYAMA T, NIWA K, WATANABE T (2012) Purification and characterization of nontoxic protein complex from serotype D 4947 botulinum toxin complex. *Protein J.* **31** : 387-392.
- 32) MUTOH S, KOGUCHI H, SAGANE Y, SUZUKI T, HASEGAWA K, WATANABE T, OHYAMA T (2003) Complete subunit structure of *Clostridium botulinum* type D toxin complex via intermediate assembly with nontoxic components. *Biochemistry* **37** : 10991-10997.
- 33) MUTOH S, KOGUCHI H, SUZUKI T, HASEGAWA K, NIWA K, OGUMA K, FUJINAGA Y, WATANABE T, OHYAMA T (2005) Four molecules of 33 kDa hemagglutinin components (HA-33) of the *Clostridium botulinum* serotype C and D toxin complexes are required to aggregate erythrocytes. *Microbiology* **151** : 3847-3858.
- 34) KOGUCHI H, SUZUKI T, HASEGAWA K, MUTOH S, WATANABE T, NIWA K, YONEYAMA T, KATOH Y, OHYAMA T (2006) Quantitative detection of gene expression and toxin complex produced by *Clostridium botulinum* serotype D strain 4947. *J. Microbiol. Method.* **67** : 416-423
- 35) SUZUKI T, WATANABE T, MUTOH, HASEGAWA, K, KOGUCHI H, FUJINAGA Y, OGUMA K, OHYAMA T (2005) Characterization of the interaction between subunits of the botulinum toxin complex produced by serotype D through tryptic susceptibility of the isolated components and complex forms. *Microbiology* **151** : 1475-1483.
- 36) HASEGAWA K, WATANABE T, SUZUKI T, YAMANO A, OIKAWA T, SATO Y, KOGUCHI H, YONEYAMA T, NIWA K, IKEDA T, OHYAMA T (2007) A novel subunit structure of *Clostridium botulinum* serotype D toxin complex with three extended arms. *J. Biol. Chem.* **282** : 24777-24783.
- 37) NAKAMURA T, KOTANI M, TONOZUKA T, IDE A, OGUMA K, NISHIKAWA A (2009) Crystal structure of the HA3 subcomponent of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin. *J. Mol. Biol.* **385** : 1193-1206.
- 38) MIYATA K, YONEYAMA T, SUZUKI T, KOGUCHI H, INUI K, NIWA K, WATANABE T, OHYAMA T (2009) Expression and stability of the nontoxic component of the botulinum toxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384** : 126-130.
- 39) MIYATA K, INUI K, MIYASHITA S, SAGANE Y, HASEGAWA K, MATSUMOTO T, YAMANO A, NIWA K, WATANABE T, OHYAMA T (2012) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Clostridium botulinum* type D nontoxic-nonhemagglutinin. *Acta Crystal. Sec. F* **86** : 227-230.
- 40) GU S, RUMPEL S, ZHOU J, STROTMEIER J, BIGALKE H, PERRY K, SHOEMAKER C B, RUMMEL A, JIN R (2012) Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex. *Science* **335** : 977-981.
- 41) INUI K, SAGANE Y, MIYATA K, MIYASHITA S, SUZUKI T, SHIKAMORI Y, OHYAMA T, NIWA K, WATANABE T (2012) Toxic and nontoxic components of botulinum neurotoxin complex are evolved from a common ancestral zinc protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419** : 500-504.
- 42) SAGANE Y, MIYASHITA S, MIYATA K, MATSUMOTO T, INUI K, HAYASHI S, SUZUKI T, HASEGAWA K, YAJIMA S, YAMANO A, NIWA K, WATANABE T (2012) Small-angle X-ray scattering reveals structural dynamics of the botulinum neurotoxin associating protein, nontoxic nonhemagglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425** : 256-260.

Structure and Function of Botulinum Toxin Complex

By

Tohru OHYAMA*

(Received December 3, 2012/Accepted December 7, 2012)

Summary : Botulinum neurotoxins (BoNTs) are the most potent toxins known in nature, causing the lethal disease known as botulism in human and animals. The BoNTs act by inhibiting neurotransmitter release from cholinergic synapses. Accidental botulism often occurs through ingestion of *Clostridium botulinum* contaminated food. Different strains of *C. botulinum* produce seven distinct serotypes of BoNTs, classified A through G. Serotypes A, B, E and F in human botulism, whereas C and D appear to be causative toxins for animal and avian botulism. All serotypes of BoNT associate non-covalently with auxiliary nontoxic proteins, thereby forming large toxin complexes (TCs), M-TC (BoNT/NANHA) and L-TC (BoNT/NTNHA/HA-70/HA-33/HA-17) in the culture medium. The formation of TCs appear not only to protect BoNTs from the hostile environment of the digestive tract but also to assist neurotoxin translocation across the intestinal mucosal layer. However, BoNT, NTNHA and HA-70 components of the TC are nicked at specific sites by a bacterial protease, leading to the appearance of many fragments on SDS-PAGE. Fortunately, the author and collaborators serendipitously found unique serotype D strain 4947 (D-4947) which produces intact M-TC and L-TC without any nicking.

In this manuscript, five topics on mainly D-4947 TC studies provided by the author and collaborators are described: (1) Specific nicking sites in the components of the serotype C and D TCs were characterized, including dichain structure in BoNT, spontaneous nicking in the NTNHA and endogenous cleavage in HA-70. (2) *In vitro* reconstitution of functional HAs of serotype C, and D-4947 L-TC assembly mechanism was achieved by the mixing of individual components, which was indistinguishable with native L-TC. Then the gene expressions of five individual D-4947 L-TC components were examined by quantitative reverse transcriptase PCR. (3) The HA-33 component of the serotypes C and D TCs played a critical role in the binding and transcytosis in intestinal epithelium, and other HA components protecting BoNT against gastrointestinal digestion, using various culture cells including Caco-2 cells, rat small intestinal epithelial cells, bovine aortic endothelial cells and equine erythrocytes. (4) A novel 14-mer subunit structure model of D-4947 L-TC was proposed on the basis of the negative stain transmission electron microscopy and X-ray crystal structure of the complex formed by two HA-33 plus one HA-17. (5) Definitive evidence was provided that both recombinant and native NTNHAs play a crucial role in protecting BoNT from proteolysis by digestive enzymes. Every single NTNHA contained a single Zn atom, of which small-angle X-ray scattering analysis of the NTNHA revealed the structural dynamics.

Key words : *Cyclamen*, Botulinum toxin, Toxin complex, X-ray crystallography, Hemagglutinin, Non-toxic protein

*Dept of Food and Cosmetic Science, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, (Present : Dept. of Health and Nutrition, Faculty of Human Science, Hokkaido Bunkyo University)