

ファーウエスタン法によるボツリヌスC型およびD型神経毒素受容体の性状解析

○塚本健太郎、竹内くみこ、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司
大阪府大・院・農学生命

【目的】ボツリヌス神経毒素は毒素型によって異なる受容体に結合すると考えられている。これまでD型神経毒素受容体の単離を目的としてニワトリ脳シナプトソームを可溶化し、その精製条件を検討してきた。今回、ファーウエスタン法により受容体蛋白質を検出し、その性状を調べた。【方法】C型およびD型神経毒素受容体結合領域(C/Hc、D/Hc)のリコンビナント蛋白を調製し、リガンドとして用いた。ニワトリ脳シナプトソームへの結合活性はフィルターアッセイ法で、可溶化画分、精製段階のフラクションの結合活性はドットブロット法で測定した。シナプトソームをn-Octyl- β -D-thioglucosideで可溶化し、標識D/Hc結合活性を指標にイオン交換および疎水クロマトグラフィーを行った。さらに得られた部分精製標品についてファーウエスタンブロットを行った。また、等電点電気泳動を行い、受容体の等電点を調べた。【結果と考察】D/Hcのシナプトソームへの結合活性は、 $K_d=2.16$ nM、 $B_{max}=5.5$ pmol/mgであった。精製段階における蛋白当たりの結合量は可溶化画分と比較してイオン交換クロマトグラフィー溶出画分で約7倍、疎水クロマトグラフィー溶出画分で約30倍に増加した。疎水クロマトグラフィー画分をSDS-PAGEで分離し、標識D/Hcを用いてファーウエスタンブロットを行った結果、10 kDa付近にバンドが認められた。1000倍量の未標識D/Hc、C/Hc存在下では結合が阻害されバンドが消失したが、A型、B型Hc存在下では阻害されなかった。標識C/Hcを用いても同様の成績が得られた。また疎水クロマトグラフィー画分をシアリダーゼおよびプロテアーゼで前処理するとニトロセルロース膜上の受容体は検出されなかった。等電点電気泳動を行った後、ゲルを細切し、抽出した溶液を調べると、pH 3-3.5付近に結合活性が認められた。以上の成績から、C型およびD型毒素受容体は共通した動態を示し、分子量約1万の酸性シアロ糖蛋白であることが示唆された。