

# ボツリヌスA型菌変異株が産生するHA複合体の構造に関する研究

馬 少博

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病原細菌学  
(指導責任者：小熊恵二 教授)

## Study for the structures of the HA complexes produced by *Clostridium botulinum* type A mutant strain

Shaobo Ma

Department of Bacteriology, Okayama University Graduate School of Medicine,  
Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

*Clostridium botulinum* produces seven neurotoxin (NTX) serotypes, classified from as A to G. In culture, NTX forms protein complexes by association with non-toxic components, such as nontoxic-nonhemagglutinin (NTNH) and hemagglutinins (HA1, HA2, HA3). *C. botulinum* serotype A produces three types of toxin complexes, M-toxin (NTX and NTNH), L-toxin (M-toxin and HAs) and LL-toxin (dimer of L-toxin). In this study, I found three HA complexes in the culture of a nontoxic mutant serotype A lacking *ntx* and *ntnh* expression. The HA complexes displayed similar banding patterns on SDS-PAGE, but the staining intensities of the HA1 and HA2 bands were different. In addition, their native-PAGE banding profiles exhibited different behaviors. The large-molecular-size HA complex showed the highest activity, similar to that of an L-toxin. Based on the combined results of the PAGE and gel-filtration profiles, the differences in molecular size among the three HA complexes were thought to be caused by different numbers of HA1 and HA2 molecules. This paper reports for the first time the purification and characterization of a native HA complex of serotype A, and suggests that the HA can form complex structures without NTX and NTNH. This may help in understanding the toxin complex assembly pathway.

キーワード：ボツリヌス毒素 (botulinum toxin), ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*), 血球凝集素 (hemagglutinin), タンパク質複合体構造 (protein complex structure)

## 緒 言

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、グラム陽性・偏性嫌気性の大桿菌であり、食中毒の原因となる致死性のボツリヌス毒素を産生している。産生する神経毒素タンパク質 (neurotoxin; NTX, 150kDa) の血清型から、菌はA～G型の7型に分類される<sup>1)</sup>。NTXは胃から腸管を経由して最終的に神経・筋接合部に到達し、シナプス小胞とシナプス前膜の融合を阻止して神経伝達物質の放出を阻害する。この一連の過程によって、ヒトや動物は神経麻痺を引き起こし、死に至ると考えられている<sup>2,3)</sup>。

自然界や培養液中において、NTXは無毒なタンパク質群と結合して複合体 (progenitor toxin) を形成している。NTXに非毒非血球凝集素 (nontoxic nonhemagglutinin;

NTNH, 130kDa) が結合したM毒素 (12S), さらに血球凝集素 (hemagglutinin; HA) が結合したL毒素 (16S), L毒素の二量体とされるLL毒素 (19S) がある<sup>4)</sup>。A型菌は3種類の毒素を、B～D型菌はL毒素とM毒素を、EおよびF型菌はM毒素のみを、G型菌はL毒素のみを産生する。近年、HA成分にはHA1, HA2, HA3 (各々, 33, 17, 70kDa) があり、HA3は内因性のプロテアーゼによってN末端側のHA3a (23kDa) およびC末端側のHA3b (53kDa) に分子内切断されること、HA1およびHA3bは赤血球や小腸上皮細胞の表面に存在するガラクトースやシアル酸にそれぞれ結合することが判明した<sup>5)</sup>。

無毒タンパク質群は、胃での酸性条件とペプシン、さらには小腸でのタンパク分解酵素に強い耐性があり、上記のようにHAは小腸上皮細胞への結合能をもつことから、経口摂取されたNTXは消化されることなく効率的に生体内に吸収されるようになり、ボツリヌス毒素の複合体構造が毒性に深く関与していると言える。

最近、毒素の生体内への吸収機構におけるHAの機能が

平成23年12月9日受理  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1  
電話：086-235-7158 FAX：086-235-7162  
E-mail：gmd20079@s.okayama-u.ac.jp

注目され、小腸上皮細胞への結合メカニズムに関する研究が進んでいる<sup>6-8)</sup>。さらにD型菌が産生する毒素複合体構造のサブユニット構造に関する研究も進んでいる<sup>9,10)</sup>。他方、ヒトへの毒性が強く、治療薬としても応用されるA型菌のLおよびLL毒素に関しては、その構造が明らかでない部分が多い。そこで本研究では、A型菌が産生するHA成分の構造に関して検討することとした。

## 材料と方法

### 1. 菌株および培養

パスツール研究所 (France, Paris) の Dr. Popoff より分与されたA型62Ant株を培養した。本菌は、*ntnh* 遺伝子ノックアウトにより、NTNH および転写領域下流にあるNTXの発現も抑制された無毒変異株である。培地や培養条件は既報に従った<sup>11)</sup>。

### 2. カラムクロマトグラフィーによる精製

培養上清からの粗分画は既報に従った<sup>11)</sup>。粗分画液を50mM酢酸緩衝液 (pH4.2) で平衡化した TOYOPEARL SP-650S (東ソー) カラム (1.4×26cm) に負荷し、同様の緩衝液で非吸着タンパク質を溶出させた。吸着したタンパク質は、NaCl濃度が0~0.5Mの直線濃度勾配になるように調製した50mM酢酸緩衝液 (pH4.2) で溶出させた。

得られた部分精製毒素液を10mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した lactose gel (EY Laboratories) を充填したカラム (0.5cm×6cm) に負荷し、同様の緩衝液で非吸着タンパク質を溶出させた。吸着したタンパク質は、0.2M lactose を含む10mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で溶出させた。

次に、遠心濃縮器で濃縮したサンプル溶液を、0.15M NaCl を含む50mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したゲル濾過カラム Superdex 200 10/30GL カラム (GEヘルスケアジャパン) へ負荷し、同様の緩衝液で溶出させた。SDS-PAGE および native-PAGE で検定後、HA複合体標品とした。

### 3. 電気泳動および染色強度解析

SDS-PAGE は、Laemmli<sup>12)</sup> の方法に従って、2-メルカプトエタノール (2-ME) を含む12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。分子量マーカーには10-250kDa Precision Plus Protein™ All Blue Standards (BIO-RAD) を用いた。非変性条件下での電気泳動 (native-PAGE) は、SDS および 2-ME を含まない7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた。ゲル上で分離したタンパク質のバンドはクマシーブリリアントブルー-R-250 (CBB) によって染色し、検出した。CBB染色したバンド強度の測定には、ImageJ ver.1.43 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いた。

### 4. ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定

HA複合体 (10~20 $\mu$ g) をゲル濾過カラム Superdex 200

10/300GL にアプライし、0.15M NaCl を含む50mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で溶出させて、その溶出液量を測定した。分子量サイズマーカーには、thyroglobulin (670kDa), bovine globulin (158kDa), chicken ovalbumin (44kDa), horse myoglobin (17kDa), vitamin B-12 (1.3kDa) を用い、検量線を作成した。測定は3回以上行い、その平均値からHA複合体の分子量を計測した。

### 5. 赤血球凝集活性 (HA 活性) の測定

96穴U底プレートのウェルに10mM PBS (pH7.4) を50 $\mu$ l入れた後、HA複合体またはL毒素溶液を50 $\mu$ l (300 $\mu$ g/ml) 添加し、同PBSで2倍段階希釈した。希釈液の入った各ウェルに50 $\mu$ lの1%ヒト赤血球浮遊液を添加した。室温で2時間反応させ、HA活性が観察された希釈段階を2<sup>n</sup>とし、それをHA titerとした。

## 結 果

ボツリヌス菌 A-62Ant 株の培養上清からタンパク質を粗精製し、TOYOPEARL SP-650S カラムクロマトグラフィーを用いてHAタンパク質を精製した。その結果、複数のタンパク質ピークが検出された (図1)。各フラクションのHA活性を測定した結果、フラクション No.64~76にかけて非常に高いHA活性が検出された。このフラクション帯のクロマトグラム形状や電気泳動解析から、複数種のタンパク質がわずかに位置を変えながら溶出されていると考えられたため、Frac-SP1 および Frac-SP2 に分けて回収した (図1A)。両フラクションのSDS-PAGEのバンドパターンは非常に類似しており、分子量の大きい方から順に、HA3b, HA1, HA3a, HA2のタンパク質バンドを確認することができた (図1B)。しかしながら、native-PAGEのバンドパターンでは、主に3本のタンパク質バンドが見られた (図1C)。これらのバンドをゲルから切り出し、SDS および 2-ME による変性処理後にSDS-PAGEに供した結果、いずれのバンドからも4種のHAバンドが確認された (データ未掲載)。このことから、いずれのバンドもHAを構成成分としたタンパク質複合体であると考えられたため、分子量の高い方から順に、L-HAs, M-HAs, S-HAsとした。

さらに精製を行うために、Frac-SP1 および Frac-SP2 の両フラクションについて、lactose gelを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。このクロマトグラフィーはHA1がlactoseに結合能を有することを利用した精製法である<sup>13)</sup>。実験の結果、Frac-SP1からは、主にM-HAsが含まれる吸着画分 Frac-Lac1を得た (図2A)。一方、非吸着画分にはS-HAsが含まれていたため回収した。また、Frac-SP2からは、主にL-HAsが含まれる吸着

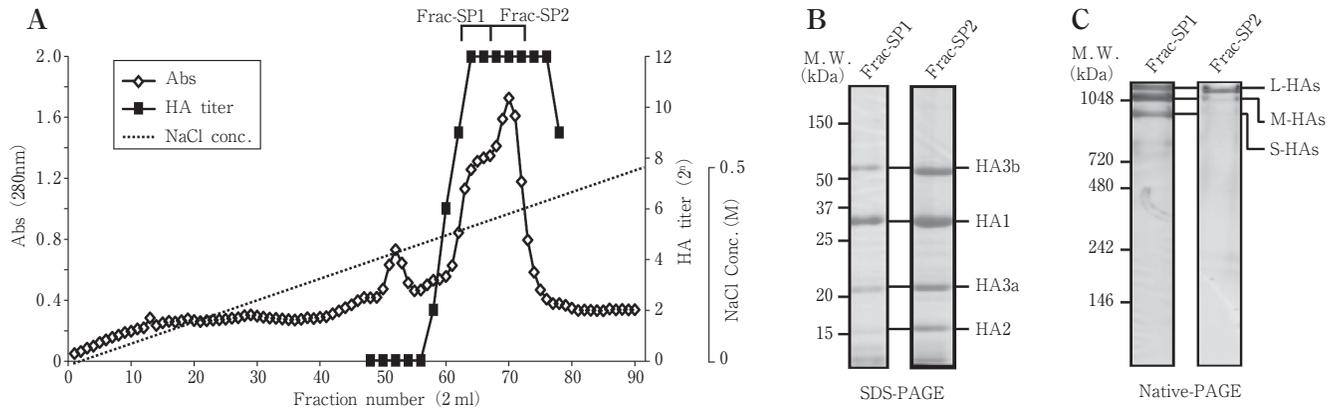


図1 HA複合体のイオン交換カラムを用いた精製

A: TOYOPEARL SP-650S イオン交換カラムによる精製のクロマトグラムを示した。カラム平衡化および非吸着タンパク質の洗浄は50mM 酢酸緩衝液 (pH4.2) で行った。吸着したタンパク質は、0~0.5M NaClの直線濃度勾配で溶出させた。B, C: HA複合体画分の電気泳動パターンを示した。SDS-PAGEは2-MEを含む12.5%ポリアクリルアミドゲル, native-PAGEは変性剤を含まない7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた。

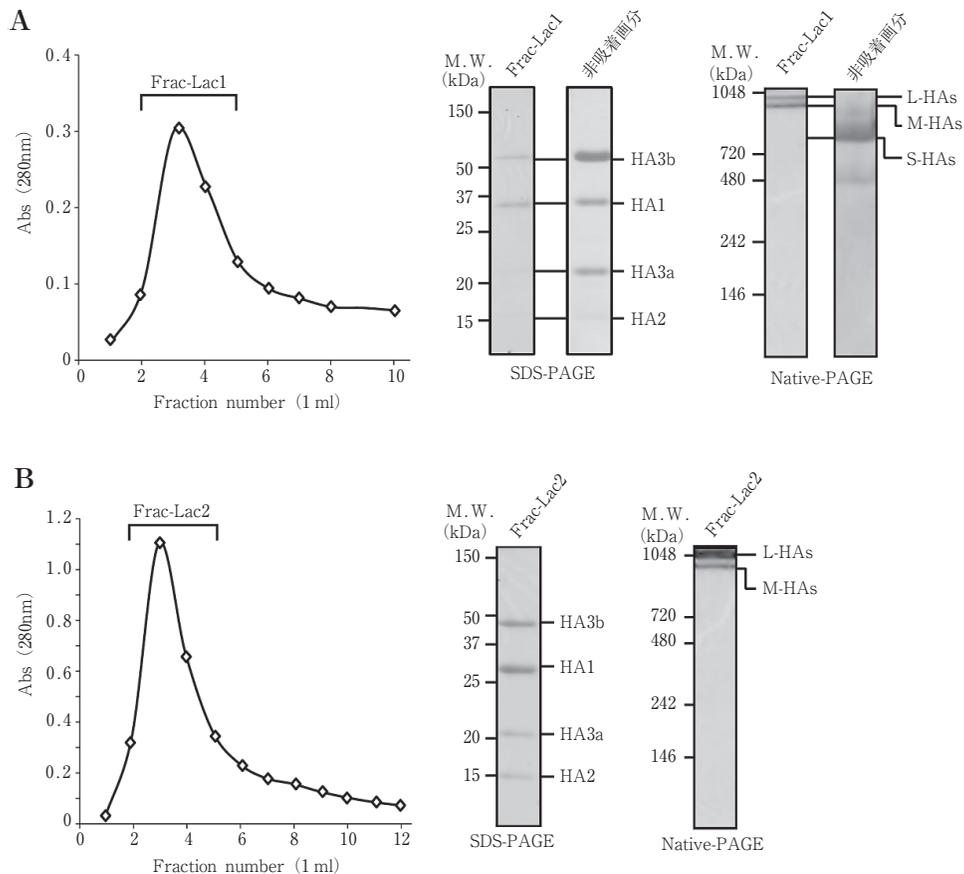


図2 HA複合体の lactose アフィニティーカラムを用いた精製

A: TOYOPEARL SP-650S イオン交換カラムによる精製で得た Frac-SP1画分をアフィニティーカラムに供した。カラム平衡化および非吸着タンパク質の洗浄は10mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で行った。吸着したタンパク質は、0.2M lactose を含む10mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で溶出させた。精製後の画分の精製度は、電気泳動で確認した。SDS-PAGEは2-MEを含む12.5%ポリアクリルアミドゲル, native-PAGEは変性剤を含まない7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた。B: Frac-SP2画分をアフィニティーカラムに供した。他は上記と同様に行った。

画分 Frac-Lac2 を得た (図 2 B). 次に, Frac-Lac1 および Frac-Lac2 を遠心濃縮チューブで濃縮した後, Superdex 200 10/300GL カラムを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った (図 3). その結果, どちらのサンプルも L-HAs と M-HAs のピークが非常に近接して溶出されたため, クロマトグラムの形状や電気泳動解析でマイナータンパク質を除外するようにして回収し, Frac-G1 を M-HAs 標品として, Frac-G2 を L-HAs 標品として回収した.

各種クロマトグラフィーを用いて精製した結果, 図 4 A および B に示すように, SDS-PAGE では同様のバンドパタ

ーンを示すが, native-PAGE では異なる分子量を示す 3 種の HA 複合体標品を得ることができた. S-HAs については, 少量の低分子量タンパク質と M-HAs が夾雑するが分離困難なため, これを以降の実験に用いる S-HAs 標品とした.

各 HA 複合体の分子量を Superdex 200 10/300GL カラムを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって測定した結果, L-HAs が 500kDa, M-HAs が 338kDa, S-HAs が 276kDa と測定された (図 4 C, 表 1). また, SDS-PAGE バンドパターンにおいて, サブユニット間の染色強度に違いが見られたため (図 4 A), 画像解析ソフトを用いて染色

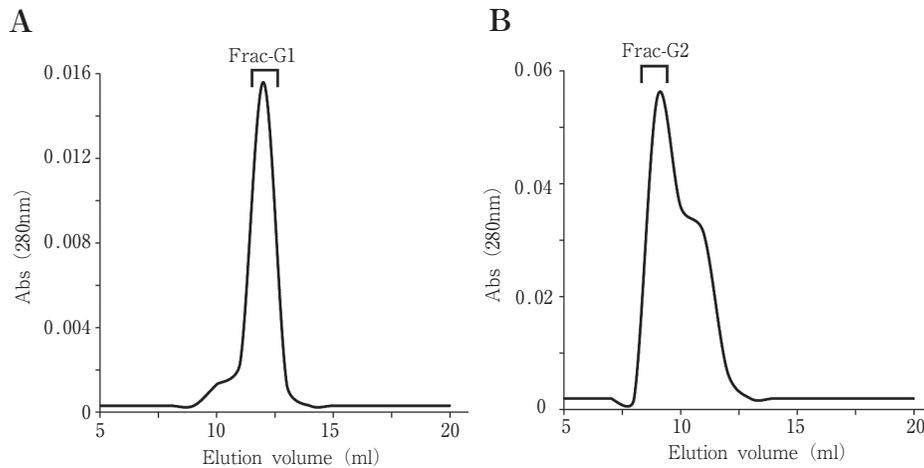


図 3 HA 複合体のゲル濾過カラムを用いた精製  
A : lactose アフィニティーカラムによる精製で得た Frac-Lac1 画分を Superdex 200 10/30GL カラムに供した. カラム平衡化および溶出は 0.15M NaCl を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で行った. B : Frac-Lac2 画分を上記と同様にゲル濾過カラムに供し溶出させた.

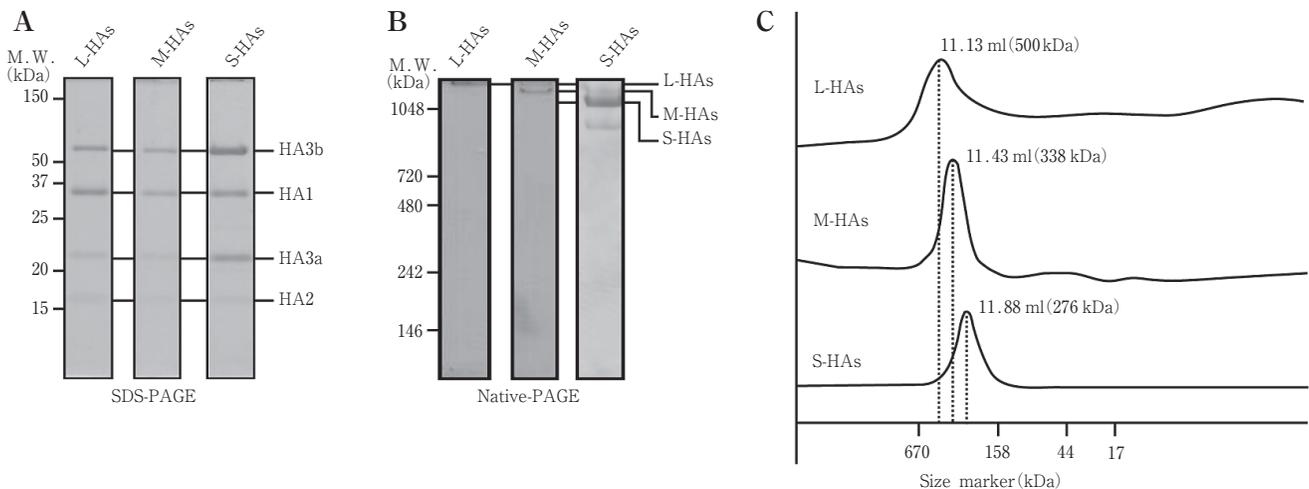


図 4 HA 複合体の分子構成と分子量測定

A, B : 精製した HA 複合体の電気泳動パターンを示した. SDS-PAGE は 2-ME を含む 12.5% ポリアクリルアミドゲル, native-PAGE は変性剤を含まない 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた. C : Superdex 200 10/300GL カラムを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーの溶出プロファイルを示した.

強度を数値化した。各複合体中のHA3bバンドの染色強度を基準に比率を検証した結果、複合体の分子量が大きくなるに従って、HA1およびHA2のバンドの染色強度が強くなっており、およその比率はS-HAs:M-HAs:L-HAs=1:2:3であった(表1)。HA活性は、複合体の分子量とともに上昇し、L-HAsが $2^{10}$ という最も高い活性を示し、A型野生株が産生するL毒素と同等のHA活性であった。

### 考 察

ボツリヌス毒素複合体を構成するサブユニットタンパク質の遺伝子群はゲノム上で隣接して存在し<sup>14-18</sup>、各々発現したサブユニットが順次結合して毒素複合体を形成すると考えられている。ボツリヌスA型毒素の場合、3種の毒素複合体(M毒素, L毒素, LL毒素)が知られているが、その形成機構については不明である。今回の実験で、3種のHAタンパク質で構成される新規の複合体を見出した。すなわち、HAのみでも複合体を形成できるということであり、NTXとNTNHで構成されたM毒素にHA複合体が結合してL毒素になる形成機構が推察される。近年、M毒素/HA3複合体やHA1/HA2複合体がD型毒素研究において報告されており<sup>9,10,19,20</sup>、毒素複合体の形成機構におけるHAの結合機序には数パターン存在し得る可能性も考えられる。

今回の実験で、サブユニットの種類は同じだが、分子量

が異なる3種類のHA複合体を見出した。NakamuraらはC型HA3が三量体を形成することを報告している<sup>21</sup>。また、Hasegawaらは2分子のHA1と1分子のHA2が結合したD型HA1/HA2複合体をX線結晶構造解析で報告するとともに、電子顕微鏡解析および種々の毒素複合体の構造特性を比較することでヘテロ14量体のL毒素構造モデルを提唱している<sup>10</sup>。これら既報と今回の実験結果に基づいて、本研究で見出した3種のA型HA複合体のサブユニット構造を図5のように推定した。すなわち、3分子で構成されたHA3複合体をベースに、2分子のHA1と1分子のHA2で構成されるHA1/HA2複合体が1セット結合することでS-HAs(HA1:HA2:HA3=2:1:3)が形成され、さらにHA1/HA2複合体が結合してM-HAs(HA1:HA2:HA3=4:2:3)となり、最終的に3セットのHA1/HA2複合体が結合した12量体のL-HAs(HA1:HA2:HA3=6:3:3)が形成されると考えられる。A型HAと高い配列相同性をもつB型HAについて、ArimitsuらはHA2が複合体の分子内部に内包されていると考察している<sup>22</sup>。またD型HAの研究では、HA1とHA3は結合できず<sup>20</sup>、HA1とHA2が結合し<sup>10,20</sup>、HA2を介して3種のHAが結合していると推察されている<sup>9</sup>。図5は、これらの報告も反映したモデルであるが、A型毒素構造の相互作用部位に関する検証は今後の課題である。

HA1は細胞表面の糖鎖を認識し、HA活性にも関与す

表1 HA複合体の分子量、HA活性およびサブユニット開のSDS-PAGE染色強度比

	分子量		HA力価	数値化した染色強度*3				HA3bを基準とした染色強度比		
	detd*1(kDa)	cald*2(Da)		HA3b	HA1	HA3a	HA2	HA1/HA3b	HA3a/HA3b	HA2/HA3b
L-HAs	500	468093	$2^{10}$	2859.4	4448.5	1442.9	1182.5	1.56	0.50	0.41
M-HAs	340	383313	$2^8$	2262.3	2650.1	1093.6	763.9	1.17	0.48	0.34
S-HAs	280	298533	$2^8$	8452.5	4437.1	4516.1	1422.2	0.52	0.53	0.17

\*1ゲル濾過法で計測した分子量。

\*2遺伝子配列から推定したアミノ酸配列を基に各HAの分子量を算出し、図5に示した分子数に基づいて各複合体の分子量を計算した。

\*3SDS-PAGE後、各タンパク質バンドの染色強度を画像解析ソフトImage Jを用いて数値化した値。

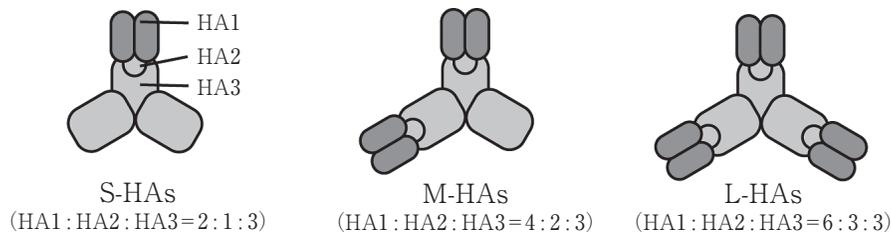


図5 HA複合体のサブユニット構造模式図

表1に示したサブユニット比からHA複合体をモデル化した。サブユニットの向きなどは、Hasegawa<sup>10</sup>ら、Arimitsuら<sup>22</sup>、Nakamuraら<sup>21</sup>の報告を参考とした。

る<sup>23-25</sup>。これを支持するように、今回の HA 複合体も HA1 の分子数が増加するに従って HA 活性が高くなっていった (表 1)。また、精製過程で S-HAs が lactose カラムに結合できなかった現象も、複合体中の HA1 が少ないことで結合力が低かったことが要因の一つであったと考えられる。また、A-62A 株 (野生株) の培養液中に、従前の L 毒素や LL 毒素と同じ SDS-PAGE バンドパターンを示すが、分子量が異なる複合体を認めており (データ未掲載)、今回の解析で見出したような HA のサブユニット比が異なる新規の A 型毒素複合体が存在していると思われる。HA1 や HA3b はアジュバントとして働き NTX 抗体が産生されやすいという結果が B 型毒素研究で報告されている<sup>26</sup>。A 型および B 型の毒素複合体は既に製剤として利用されており、今回の結果をもとに A 型だけでなく B 型の毒素複合体についても詳細に解析していく必要があると思われる。

A および B 型 NTX の X 線結晶構造が解析されて以降<sup>27,28</sup>、Protein Data Bank には活性ドメインを中心に 90 以上もの NTX 構造データが登録されている。一方、無毒タンパク質群については、数例の HA 立体構造があるのみである<sup>10,21,23,29</sup>。このように、毒性本体である NTX を中心に毒素の構造が研究されているが、毒素の構造と機能の関係を理解するには複合体レベルでの研究が必要不可欠である。現在、A 型毒素は製剤化され眼瞼痙攣や斜頸などの治療や美容整形に用いられている<sup>30</sup>。その応用範囲は今なお広がっているが、毒素構造に関しては不明な点が非常に多い。本研究で構造に関する知見が多数得られたことは、より安全な医療にも繋がると期待できる。

## 結 論

ボツリヌス A 型菌が産生する HA は、NTX や NTNH が存在しなくても複合体を形成すること、および HA3 に HA1 や HA2 が結合して最大 12 量体の HA 複合体となる形成機構が示唆された。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学教室の小熊恵二教授に深謝致します。また、直接実験のご指導を頂いた同教室の鈴木智典先生に感謝致します。

## 文 献

- 1) Sugiyama H : *Clostridium botulinum* neurotoxin. *Microbiol Rev* (1980) 44, 419-448.
- 2) Oguma K, Fujinaga Y, Inoue K : Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins. *Microbiol Immunol* (1995) 39, 161-168.
- 3) Montecucco C, Schiavo G : Tetanus and botulism neurotoxins : a new group of zinc proteases. *Trends Biochem Sci* (1993) 18,

- 324-327.
- 4) Sakaguchi G : *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmacol Ther* (1982) 19, 165-194.
- 5) Oguma K, Inoue K, Fujinaga Y, Yokota Y, Watanabe T, Ohyama T, Takeshi K, Inoue K : Structure and Function of *Clostridium botulinum* Progenitor Toxin. *J Toxicol Toxin Reviews* (1999) 18, 17-34.
- 6) 阪口玄二 : ボツリヌス菌毒素の構造と機能. *日細誌* (1988) 43, 951-960.
- 7) Matsumura T, Jin Y, Kabumoto Y, Takegahara Y, Oguma K, Lencer WI, Fujinaga Y : The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell Microbiol* (2008) 10, 355-364.
- 8) Couesnon A, Shimizu T, Popoff MR : Differential entry of botulinum neurotoxin A into neuronal and intestinal cells. *Cell Microbiol* (2009) 11, 289-308.
- 9) Suzuki T, Watanabe T, Mutoh S, Hasegawa K, Kouguchi H, Sagane Y, Fujinaga Y, Oguma K, Ohyama T : 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* (2005) 151, 1475-1483.
- 10) Hasegawa K, Watanabe T, Suzuki T, Yamano A, Oikawa T, Sato Y, Kouguchi H, Yoneyama T, Niwa K, Ikeda T, Ohyama T : A novel subunit structure of *Clostridium botulinum* serotype D toxin complex with three extended arms. *J Biol Chem* (2007) 282, 24777-24783.
- 11) Lee JC, Yokoyama T, Hwang HJ, Arimitsu H, Yamamoto Y, Kawasaki M, Takigawa T, Takeshi K, Nishikawa A, Kumon H, Oguma K : Clinical application of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin purified by a simple procedure for patients with urinary incontinence caused by refractory destrusor overactivity. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2007) 51, 201-211.
- 12) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) 227, 680-685.
- 13) Arimitsu H, Inoue K, Sakaguchi Y, Lee J, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohyama T, Hirst R, Oguma K : Purification of fully activated *Clostridium botulinum* serotype B toxin for treatment of patients with dystonia. *Infect Immun* (2003) 71, 1599-1603.
- 14) Henderson I, Whelan SM, Davis TO, Minton NP : Genetic characterisation of the botulinum toxin complex of *Clostridium botulinum* strain NCTC 2916. *FEMS Microbiol Lett* (1996) 140, 151-158.
- 15) East AK, Bhandari M, Stacey JM, Campbell KD, Collins MD : Organization and phylogenetic interrelationships of genes encoding components of the botulinum toxin complex in proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B, and F : evidence of chimeric sequences in the gene encoding the nontoxic nonhemagglutinin component. *Int J Syst Bacteriol* (1996) 46, 1105-1112.

- 16) Ohyama T, Watanabe T, Fujinaga Y, Inoue K, Sunagawa H, Fujii N, Inoue K, Oguma K : 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* (1995) 39, 457-465.
- 17) Tsuzuki K, Kimura K, Fujii N, Yokosawa N, Oguma K : The complete nucleotide sequence of the gene coding for the nontoxic-nonhemagglutinin component of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin. *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 183, 1273-1279.
- 18) Marvaud JC, Gibert M, Inoue K, Fujinaga Y, Oguma K, Popoff MR : botR/A is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non-toxin protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Mol Microbiol* (1998) 29, 1009-1018.
- 19) Kouguchi H, Watanabe T, Sagane Y, Sunagawa H, Ohyama T : *In vitro* reconstitution of the *Clostridium botulinum* type D progenitor toxin. *J Biol Chem* (2002) 277, 2650-2656.
- 20) Mutoh S, Kouguchi H, Sagane Y, Suzuki T, Hasegawa K, Watanabe T, Ohyama T : Complete subunit structure of the *Clostridium botulinum* type D toxin complex via intermediate assembly with nontoxic components. *Biochemistry* (2003) 42, 10991-10997.
- 21) Nakamura T, Kotani M, Tonozuka T, Ide A, Oguma K, Nishikawa A : Crystal structure of the HA3 subcomponent of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin. *J Mol Biol* (2009) 385, 1193-1206.
- 22) Arimitsu H, Sakaguchi Y, Lee JC, Ochi S, Tsukamoto K, Yamamoto Y, Ma S, Tsuji T, Oguma K : Molecular properties of each subcomponent in *Clostridium botulinum* type B haemagglutinin complex. *Microb Pathog* (2008) 45, 142-149.
- 23) Arndt JW, Gu J, Jaroszewski L, Schwarzenbacher R, Hanson MA, Lebeda FJ, Stevens RC : The structure of the neurotoxin-associated protein HA33/A from *Clostridium botulinum* suggests a reoccurring beta-trefoil fold in the progenitor toxin complex. *J Mol Biol* (2005) 346, 1083-1093.
- 24) Inoue K, Fujinaga Y, Honke K, Arimitsu H, Mahmut N, Sakaguchi Y, Ohyama T, Watanabe T, Inoue K, Oguma K : *Clostridium botulinum* type A haemagglutinin-positive progenitor toxin (HA(+)-PTX) binds to oligosaccharides containing Gal beta1-4GlcNAc through one subcomponent of haemagglutinin (HA1). *Microbiology* (2001) 147, 811-819.
- 25) Nakamura T, Tonozuka T, Ito S, Takeda Y, Sato R, Matsuo I, Ito Y, Oguma K, Nishikawa A : Molecular diversity of the two sugar-binding sites of the  $\beta$ -trefoil lectin HA33/C (HA1) from *Clostridium botulinum* type C neurotoxin. *Arch Biochem Biophys* (2011) 512, 69-77.
- 26) Lee JC, Yokota K, Arimitsu H, Hwang HJ, Sakaguchi Y, Cui J, Takeshi K, Watanabe T, Ohyama T, Oguma K : Production of anti-neurotoxin antibody is enhanced by two subcomponents, HA1 and HA3b, of *Clostridium botulinum* type B 16S toxin-haemagglutinin. *Microbiology* (2005) 151, 3739-3747.
- 27) Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC : Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* (1998) 5, 898-902.
- 28) Swaminathan S, Eswaramoorthy S : Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol* (2000) 7, 693-699.
- 29) Inoue K, Sobhany M, Transue TR, Oguma K, Pedersen LC, Negishi M : Structural analysis by X-ray crystallography and calorimetry of a haemagglutinin component (HA1) of the progenitor toxin from *Clostridium botulinum*. *Microbiology* (2003) 149, 3361-3370.
- 30) Aoki KR : Botulinum toxin : a successful therapeutic protein. *Curr Med Chem* (2004) 11, 3085-3092.