



ทอกซินโบ툴ินัม: ชีวิตยาระดับโมเลกุล

นิชา เจริญศรี

บทคัดย่อ

จากเหตุการณ์การระบาดของโรคโบทูลิซึมที่จังหวัดน่าน ซึ่งมีผู้ป่วยที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจำนวนมากกว่า 160 คน โดยสาเหตุของการระบาดครั้งนี้มาจากการนำหน่อไม้ปิ้งที่มีการปนเปื้อนมาปรุงอาหารรับประทาน เหตุการณ์นี้ส่งผลกระทบต่อระบบการสาธารณสุขอย่างมาก และแสดงให้เห็นว่าการขาดความรู้และการตระหนักถึงอันตราย ทำให้โรคที่คล้ายกับสูญหายไปเกิดการระบาดที่รุนแรงได้ บทความนี้จึงขอทบทวนความรู้เกี่ยวกับเชื้อที่ก่อโรคทอกซินที่เชื้อสร้าง และกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งมีความชัดเจนมากขึ้นในระยะไม่กี่ปีมานี้ โรคโบทูลิซึมเกิดจากทอกซินโบทูลินัมที่สร้างจากเชื้อ *Clostridium* บางชนิด ได้แก่ *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum* และ *C. argentine* ทอกซินที่สร้างจากเชื้อเหล่านี้แบ่งเป็น 7 ชนิด (A, B, C, D, E, F และ G) ตามลักษณะแอนติเจน ซึ่งการศึกษาทางพันธุกรรมพบว่าจีโนมที่กำหนดทอกซินโบทูลินัม อาจอยู่บนโครโมโซม พลาสมิด หรือ แบคทีริโอไฟาจ เมื่อทอกซินโบทูลินัมถูกสร้างออกมาจะมีการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลโดยเกิดพันธะไดซัลไฟด์และถูกย่อยออกเป็นเปปไทด์ 2 เส้นที่ยึดกันไว้ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เปปไทด์เส้นหนึ่งที่มีขนาดใหญ่กว่าทำหน้าที่จับกับตัวรับที่ผิวเซลล์ประสาท และทำให้เกิดโครงสร้างคล้ายท่อเพื่อส่งเปปไทด์เส้นที่มีขนาดเล็กเข้าสู่ไซโทพลาซึม จากนั้นเปปไทด์เส้นที่มีขนาดเล็กทำหน้าที่ตัดย่อยโปรตีนของเซลล์โฮสต์ โดยเฉพาะโปรตีนที่เรียกว่า SNARE ออกฤทธิ์ก็จะทำให้สารสื่อประสาทไม่สามารถหลั่งออกมาจากเซลล์ประสาท กล้ามเนื้อจึงขาดการกระตุ้นและเกิดสภาพอัมพาตขึ้น

คำรหัส: Clostridium •genetics •metalloendoprotease •acetylcholine •paralysis •ganglioside •SNARE proteins.

บทนำ

จากกรณีที่เกิดการระบาดของโรคโบทูลิซึมขึ้นที่จังหวัดน่าน เมื่อประมาณกลางเดือนมีนาคม พ.ศ. 2549 ที่ผ่านมาโดยมีผู้ป่วยจำนวนมากกว่า 160 ราย และผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงต้องได้รับการรักษาดูแลอย่างต่อเนื่องเป็นจำนวนมากถึงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ได้ส่งผลกระทบต่อประชาชนและผู้เกี่ยวข้องทางการแพทย์อย่างมาก เนื่องจากโรคนี้มีอุบัติการณ์ต่ำดังนั้นความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างทอกซินโบทูลินัมที่เป็นสาเหตุและการเป็นพิษของทอกซิน จึงได้รับความสนใจเฉพาะในวงแคบ ในปัจจุบันความรู้ใหม่ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของทอกซินในระดับโมเลกุลมีความชัดเจนมากขึ้น

ดังนั้นบทความนี้ขอนำความรู้ทางชีววิทยาในระดับโมเลกุลของทอกซินโบทูลินัมมาทบทวน เพื่อให้เกิดความเข้าใจและตระหนักถึงฤทธิ์ของทอกซินที่ได้รับการยอมรับว่ามีฤทธิ์รุนแรงที่สุดในบรรดาทอกซินที่มีในธรรมชาติ

ทอกซินโบทูลินัม (Botulinum toxin, BoNT) เป็นทอกซินที่เป็นพิษต่อระบบประสาทที่รุนแรงที่สุด จากการศึกษาพบว่าปริมาณของทอกซินโบทูลินัมในระดับนาโนกรัม ก็สามารถทำให้สัตว์หรือคนเสียชีวิตได้ เช่นในหนู ถ้าได้รับทอกซินโดยการฉีดทางช่องท้องในปริมาณเพียง 1.2 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ก็สามารถทำให้หนูตายได้ ความรุนแรงของทอกซินโบทูลินัมต่อคน คาดว่ามีระดับเดียวกับในหนู แต่สัตว์บางชนิด เช่น กระต่าย

ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก และศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป). คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Botulinum toxin: molecular biology

Nicha Charoensri

Abstract

A large outbreak of botulism has been occurred in Nan, a province in the Northern of Thailand. More than hundred and sixty patients have been hospitalized. Botulinum toxin, was responsibility for this outbreak, was found in homemade preserved bamboo shoot which had not been properly prepared. This incidence implies that botulism, a rare preventable, severe disease could occur as a result of lacking of knowledge. Knowledge of the toxin and its molecular mechanism can help personnel to understand the nature of the disease. Therefore the objective of this article is to review the botulinum toxin, particularly its molecular biology. Botulinum toxins can be classified into 7 types (A, B, C, D, E, F and G) based on theirs antigenic properties. Only few species of *Clostridium* including *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum*, and *C. argentinense*, can produce botulinum toxins. It is interesting that botulinum toxin encoded by genes found in chromosome, plasmid, or bacteriophage. The botulinum toxin protein is posttranslationally modified to have an interchain disulfide bond and be cleaved into 2 polypeptide chains, heavy and light chains. The heavy chain can bind to particular cell surface receptors and form membrane channel structure in order to drive the light chain into the cytoplasm. The light chain, containing a histidine motif of zinc-dependent metalloendoprotease, once in the cytoplasm, it can specifically cleave particular proteins of SNARE complex in host cells. The SNARE complex composes of SNAP, VAMP/synaptobrevin and HPC-1/syntaxin. This complex can drive acetylcholine vesicles to fuse to the plasma membrane leading to release of neurotransmitter. Cleavage of SNARE proteins therefore results in blockage of neurotransmitter release and causes paralysis.

Key words: *Clostridium* •genetics •metalloendoprotease •acetylcholine •paralysiss •ganglioside •SNAREproteins.

และถึงพบว่ามีควมไวต่อพิษสูงกว่คนและหนู นอกจากนี้ปริมาณของพิษที่ได้รับโดยการกินต้องใช้ปริมาณมากกว่าการฉีดจึงจะทำให้เสียชีวิต^{1, 2}

ชนิดของพิษโบทูลินัม

พิษโบทูลินัมที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท สามารถจำแนกออกเป็น 7 ชนิด ได้แก่ ชนิด A, B, C, D, E, F และ G โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะแอนติเจน

ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Neutralization test กับแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของพิษ^{3,4} พิษโบทูลินัมที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของโรคโบทูลิซึมในคน คือ ชนิด A, B, E, และ F⁵ อย่างไรก็ตามชนิดของพิษโบทูลินัมที่พบบ่อยอาจแตกต่างกันตามภูมิภาค เช่น ชนิดของพิษโบทูลินัมที่พบบ่อยในสหรัฐอเมริกา คือ ชนิด A, B และ E,⁶ สำหรับพิษโบทูลินัมชนิดที่มีฤทธิ์รุนแรงที่สุด คือ ชนิด A^{6,7}

Department of Clinical Microbiology and Center for Research and Development in Medical Diagnostic Laboratory,
Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

แบคทีเรียที่สร้างทอกซินโบ툴ินัม

ทอกซินโบ툴ินัมสร้างโดย *Clostridium* บางชนิด ได้แก่ *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum* และ *C. argentinense* โดย *C. botulinum* สร้างทอกซินชนิด A, B, C, D, E และ F ส่วน *C. baratii* สร้างได้เฉพาะชนิด F^{8,9} และ *C. butyricum* สร้างเฉพาะชนิด E^{9,10,11} สำหรับ *C. argentinense* ซึ่งแต่เดิมเคยจำแนกเป็น *C. botulinum* ต่อมาพบว่ามีความแตกต่างและคุณสมบัติที่แตกต่างจาก *C. botulinum* อื่นๆ จึงได้จัดเป็นชนิดใหม่ และเชื่อนี้สร้างทอกซินชนิด G^{12,13}

ในธรรมชาติ *Clostridium* ชนิดที่สร้างทอกซินมีทั้งสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินและไม่สร้างทอกซิน โดยส่วนใหญ่ของสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินได้มักจะสร้างทอกซินเพียงชนิดเดียว^{4,14} แต่มี *C. botulinum* บางสายพันธุ์ซึ่งพบเพียงจำนวนน้อยที่สร้างทอกซินได้มากกว่า 1 ชนิด เช่น สายพันธุ์ที่สร้างทอกซินทั้งชนิด A และชนิด B¹⁵ หรือสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กที่สร้างทอกซินทั้งชนิด B และ F¹⁸ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ *C. botulinum* สายพันธุ์ที่สร้างทอกซินชนิด A และมีจีนของทอกซินชนิด B แต่ไม่มีการสร้างทอกซินชนิด B^{16, 17}

พันธุกรรมที่กำหนดทอกซินโบ툴ินัม

ทอกซินโบ툴ินัมเป็นโปรตีนซึ่งกำหนดโดยจีนที่อาจพบอยู่บนโครโมโซม พลาสมิด หรือ อยู่ในพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจ (bacteriophage) (ซึ่งอาจอยู่เป็นอิสระ หรือแทรกเป็น prophage ในโครโมโซมของแบคทีเรีย) โดยจีนกำหนดทอกซินชนิด A, B, E และ F จาก *C. botulinum* พบอยู่บนโครโมโซม แต่จีนกำหนดทอกซินชนิด E มีรายงานที่แสดงว่าจีนอยู่ในพลาสมิดด้วย^{11,19,20} ส่วนจีนกำหนดทอกซินชนิด C อยู่ในพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจ เช่น แบคทีเรียโอฟาจ C-ST²¹ และจีนของทอกซินชนิด D พบว่าอยู่ในพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจที่อยู่แทรกในโครโมโซมของแบคทีเรีย^{22,23} สำหรับจีนกำหนดทอกซินชนิด G จาก *C. argentinense* พบอยู่บนพลาสมิด^{13,24}

จากการที่จีนกำหนดทอกซินโบ툴ินัมชนิดต่างๆพบได้ทั้งในโครโมโซม พลาสมิด และในพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟาจ รวมทั้งจากการที่มี *Clostridium* หลายชนิดมีจีนของทอกซินโบ툴ินัม เป็นข้อบ่งชี้ว่าพันธุกรรมของทอกซินโบ툴ินัม น่าจะมีต้นกำเนิดมาจากพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติในการเคลื่อนย้ายตัวเองได้ (mobile genetic element) ซึ่งจากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. botulinum* type A, Hall strain (ATCC3502) ให้ผลสนับสนุนข้อสังเกตดังกล่าว โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในบริเวณชุดของจีนทอกซินโบ툴ินัม นั้น มีความคล้ายคลึงอย่างมากกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ insertion sequence (IS) ชนิด IS1069 ที่พบในเชื้อ *Lactococcus lactis*²⁵

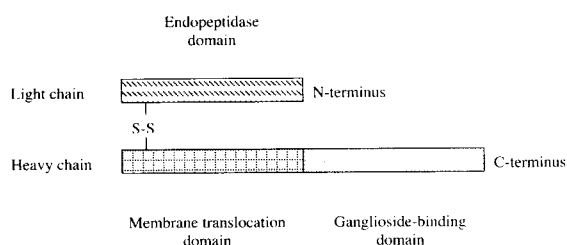
ลักษณะของโปรตีนทอกซินโบ툴ินัม

ทอกซินโบ툴ินัมเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 150 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดแอมิโน ประมาณ 1,250-1,300 กรดแอมิโน ขึ้นอยู่กับชนิดของทอกซิน เช่น ทอกซินชนิด A จาก *C. botulinum* สายพันธุ์ Hall (Allergan) ประกอบด้วยกรดแอมิโน 1,296 ตัว²⁶ และทอกซินชนิด B จาก *C. botulinum* สายพันธุ์ Danish มีขนาด 1,291 กรดแอมิโน²⁷ ส่วนทอกซินชนิด E จาก *C. botulinum* สายพันธุ์ NCTC11219 มีขนาด 1,252 กรดแอมิโน²⁸ เป็นต้น

ทอกซินโบ툴ินัมที่สร้างแล้วจะเกิดการดัดแปลงบางอย่าง ได้แก่ เกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดแอมิโนซิสเทอีน (cysteine) ที่ตำแหน่งประมาณ 430 และ 460 รวมทั้งเกิดการตัดพันธะเปปไทด์ที่ตำแหน่งกรดแอมิโนที่อยู่ระหว่างกรดแอมิโนซิสเทอีนที่เกิดพันธะไดซัลไฟด์ หลังจากการตัดพันธะเปปไทด์ดังกล่าวจะได้เป็นสายพอลิเปปไทด์ 2 เส้นที่ยังคงยึดติดกันอยู่ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (ดังแสดงในรูปที่ 1) พอลิเปปไทด์ 2 เส้นนี้ เส้นที่มีขนาดใหญ่กว่าเรียกว่า heavy chain มีขนาดประมาณ 100 กิโลดาลตัน ส่วนอีกเส้นมีขนาดเล็กกว่าเรียกว่า light chain มีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน²⁹

พอลิเปปไทด์ chain heavy chain มีส่วนของโมเลกุลทางด้านปลายคาร์บอกซี (Carboxy terminus) ขนาดประมาณครึ่งหนึ่งของพอลิเปปไทด์ เรียกว่า ganglioside-binding domain มีความสามารถในการจับกับโมเลกุลน้ำตาลที่คาดว่าเป็นส่วนประกอบของตัวรับทอกซิน (receptor) ที่อยู่บนผิวเซลล์ประสาท และอีกส่วนหนึ่งซึ่งอยู่ปลายอีกด้านหนึ่ง มีกรดแอมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) อยู่ พอลิเปปไทด์ส่วนนี้สามารถแทรกตัวเองเข้าไปในชั้นไขมัน และทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นท่อกวลงภายในชั้นไขมันได้ เรียกส่วนของพอลิเปปไทด์ส่วนนี้ว่า membrane translocation domain^{29, 30}

สำหรับพอลิเปปไทด์ chain light chain มีส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ เรียกว่า endopeptidase domain โดยมีกรดแอมิโนจำเพาะบริเวณหนึ่งมีลำดับเป็น Histidine-Glutamic acid-X-X-Histidine (X เป็นกรดแอมิโนตัวใดก็ได้) ลำดับกรดแอมิโนจำเพาะนี้เรียกว่า Histidine motif ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น Zinc-dependent metalloendopeptidase³¹ คือเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลโปรตีนโดยอาศัยโมเลกุลสังกะสีร่วมด้วย



รูปที่ 1 โมเลกุลทอกซินที่ผ่านการดัดแปลงแล้วประกอบด้วยพอลิเปปไทด์เส้นใหญ่ หรือ heavy chain ซึ่งมี membrane translocation domain และ Ganglioside-binding domain และพอลิเปปไทด์เส้นเล็ก หรือ light chain ที่มี endopeptidase domain และพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมพอลิเปปไทด์ทั้งสอง

กลไกการออกฤทธิ์ของทอกซินโบทูลินัม

ทอกซินโบทูลินัมมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาท (acetylcholine) จากเซลล์ประสาท ซึ่งสารสื่อประสาทเป็นสัญญาณในการกระตุ้นสั่งงานเซลล์กล้ามเนื้อ ถ้าไม่มีสัญญาณกระตุ้นกล้ามเนื้อก็จะไม่ทำงาน เกิดอาการอัมพาตของอวัยวะต่างๆ ถ้าได้รับทอกซินปริมาณมากก็จะมีผลรุนแรงถึงเสียชีวิตเนื่องจากอวัยวะที่สำคัญ เช่น หัวใจ หรืออวัยวะที่ควบคุมการหายใจไม่ทำงาน

ทอกซินโบทูลินัมทั้ง 7 ชนิดแม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาทจากเซลล์ประสาทเช่นเดียวกัน แต่กลไกการออกฤทธิ์บางอย่างอาจแตกต่างกันไป เช่น ตัวรับบนผิวเซลล์ โปรตีนเป้าหมาย ระยะเวลาของการออกฤทธิ์ของทอกซิน เป็นต้น ผลการศึกษาที่นำมาสรุปในบทความนี้โดยส่วนใหญ่เป็นของทอกซินโบทูลินัมชนิด A

ตัวรับที่ผิวเซลล์ต่อทอกซินโบทูลินัม

ในการออกฤทธิ์ของทอกซินโบทูลินัมนั้น ทอกซินจะต้องเข้าไปออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ซึ่งขบวนการเข้าเซลล์ของทอกซินเป็นขบวนการที่จำเพาะ และมีโมเลกุลจำเพาะที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวรับที่ผิวเซลล์ โดย ganglioside-binding domain ของพอลิเปปไทด์ chain heavy chain เป็นส่วนที่ทำหน้าที่จับกับตัวรับบนผิวเซลล์จากผลการศึกษาชี้ว่าโมเลกุลที่เป็นตัวรับน่าจะประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลประเภท gangliosides โดยเฉพาะอย่างยิ่ง GD1b, GT1b และ GQ1b (เป็นกลุ่มโมเลกุลประเภท complex glycosphingolipids)^{32,33} ทั้งนี้เนื่องจากพบว่า เมื่อนำเซลล์มาเพาะบ่มกับ neuraminidase (ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดโมเลกุลน้ำตาล sialic acid ที่เป็นองค์ประกอบของ ganglioside) จะทำให้ทอกซินโบทูลินัมไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ประสาทได้³⁴ นอกจากนี้ยังมีรายงานแสดงว่าโปรตีน synaptotagmin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผิวเซลล์ก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจับของทอกซินชนิด A, B, E และชนิด G^{33, 35, 36} สำหรับทอกซินชนิด D เนื่องจากไม่มีตัวรับที่จำเพาะต่อทอกซินนี้บนผิวเซลล์ประสาทของคน แต่มีตัวรับที่เซลล์ประสาทของวัว-ควายจึงทำให้เกิดโรคโบทูลิซึมเฉพาะในวัว-ควายและไม่เกิดโรคในคน³⁷

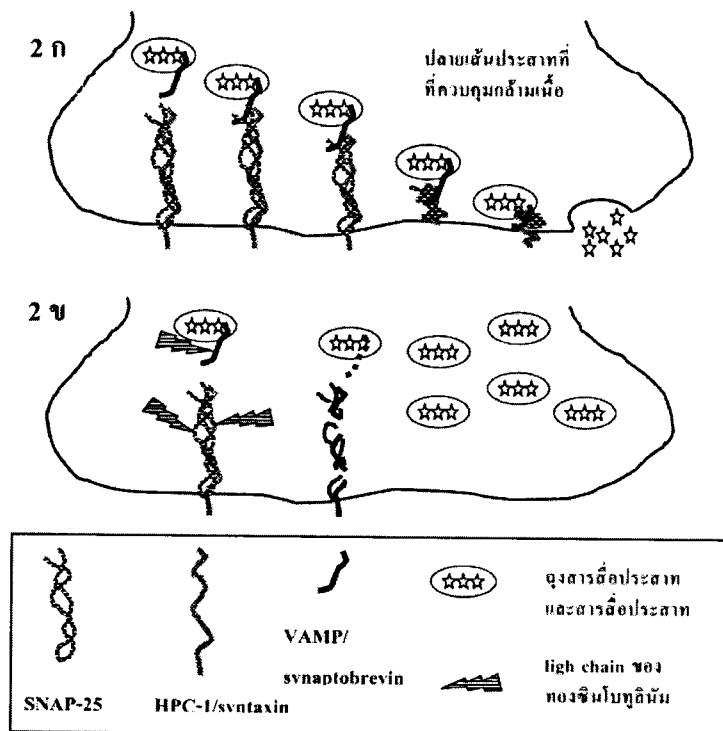
การนำทอกซินโบทูลินัมเข้าสู่เซลล์ประสาท

ภายหลังจากทอกซินจับกับตัวรับที่ผิวเซลล์แล้วจะเกิดขบวนการ endocytosis ซึ่งเป็นขบวนการที่ต้องใช้พลังงาน^{29,34,38,39} โดยเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณที่มีทอกซินจับอยู่เกิดการเว้าเข้ามาภายในเซลล์ และมีการเชื่อมกันของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เว้าเข้ามาเกิดเป็นถุง เรียกว่า endosome หลังจากนั้นความเป็นกรด-ด่างภายใน endosome มีการเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดสภาพที่เป็นกรดขึ้น มีผลทำให้โมเลกุลของทอกซินเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง²⁹ จากเดิมที่ส่วน membrane translocation domain ซึ่งมีกรดแอมิโนที่ไม่ชอบน้ำและอยู่ในรูปร่างที่มีการบิดงอส่วนนี้ไว้ เกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้ส่วน membrane translocation domain เผยยื่นออกมา และสามารถแทรกตัวเข้าไปในเยื่อไขมันที่เป็นผนังของ endosome

^{40,41,42} และเกิดเป็นโครงสร้างคล้ายท่อกลางที่เปิดเข้าสู่ไซโทพลาซึม⁴³ หลังจากนั้นโมเลกุลของทอกซินส่วน light chain จะถูกส่งผ่านผนัง endosome โดยทางท่อกลางนี้เข้าสู่ไซโทพลาซึม⁴⁴ สำหรับพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมระหว่าง heavy chain และ light chain คาดว่าสลายไปเนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดของ endosome

ฤทธิ์ของทอกซินโบทูลินัมในการยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาท

เมื่อ light chain ของทอกซินโบทูลินัมเข้าสู่ไซโทพลาซึมแล้ว จะออกฤทธิ์โดยการย่อยโปรตีนที่สำคัญในขบวนการหลั่งสารสื่อประสาททำให้สารสื่อประสาทที่บรรจุไว้ในถุงไม่สามารถหลั่งออกจากเซลล์ประสาทได้ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 การหลั่งสารสื่อประสาทและการออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาทโดยทอกซินโบทูลินัม จากการทำงานร่วมกันของโปรตีน SNARE ได้แก่ SNAP-25 HPC-1/syntaxin และ VAMP/synaptobrevin ทำให้ถุงบรรจุสารสื่อประสาทถูกนำมายังเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการเชื่อมกันของผนังถุงสารสื่อประสาทกับเยื่อหุ้มเซลล์ (2ก) เมื่อ light chain ของทอกซินโบทูลินัมเข้าไปภายในเซลล์ และย่อยโปรตีนของ SNARE complex ทำให้ถุงบรรจุสารสื่อประสาทไม่ถูกนำมายังเยื่อหุ้มเซลล์ และไม่มีการหลั่งสารสื่อประสาท (2ข)

บทบาทของโครงสร้าง SNARE ในการหลั่งสารสื่อประสาท

เมื่อเซลล์ประสาทสร้างสารสื่อประสาทแล้วจะถูกเก็บไว้ในถุงภายในเซลล์ โดยเฉพาะบริเวณปลายเซลล์ประสาทที่มาควบคุมกล้ามเนื้อ เมื่อมีสัญญาณกระแสประสาทเกิดขึ้นเซลล์ประสาทที่ถูกกระตุ้นจะเกิดขบวนการขนย้ายถุงสารสื่อประสาทมายังบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเกิดการเชื่อมรวมระหว่างเยื่อหุ้มถุงสารสื่อประสาทกับเยื่อหุ้มเซลล์^{45,46} ทำให้สารสื่อประสาทภายในถุงถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ประสาทเพื่อไปจับกับตัวรับที่ผิวเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งจะเกิดการกระตุ้นเซลล์กล้ามเนื้อให้ทำงานต่อไป ผลการศึกษาในระดับโมเลกุลได้ให้ความกระจ่างมากขึ้นเกี่ยวกับกลไกที่ทำให้เยื่อหุ้มถุงสารสื่อประสาท ซึ่งมีโครงสร้างเป็นชั้นฟอสโฟลิปิดสองชั้น เกิดการเชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นชั้นฟอสโฟลิปิดสองชั้นเช่นกัน ซึ่งขบวนการดังกล่าวอาศัยการทำงานของโปรตีนกลุ่มหนึ่งเรียกว่า SNARE^{47,48}

SNARE ประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญ 3 ชนิด และเป็นโมเลกุลเป้าหมายที่ทอกซินโบทูลินัมออกฤทธิ์ ได้แก่ SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), VAMP (vesicle-associated membrane protein)/synaptobrevin และ HPC-1/syntaxin⁴⁷ ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดมีลักษณะและตำแหน่งที่อยู่แตกต่างกันไปดังนี้

SNAP-25 เป็นโปรตีนที่อยู่ผิวด้านไซโทพลาซึมของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีกรดแอมิโนซิสเทอีน บริเวณกลางโมเลกุลที่ถูกดัดแปลงเป็น palmitoylated cysteines ทำหน้าที่เป็นตัวยึดโมเลกุลของโปรตีนนี้ไว้กับชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นปลายทั้ง 2 ของโปรตีน (ปลายคาร์บอกซี และ ปลายแอมิโน) จะมีลักษณะยื่นเข้ามาภายในไซโทพลาซึม^{47,53}

VAMP/synaptobrevin เป็นโปรตีนที่อยู่เยื่อหุ้มถุงบรรจุสารสื่อประสาท โดยปลายแอมิโนของ VAMP/synaptobrevin เป็นส่วนที่ยื่นออกมาภายในไซโทพลาซึม และส่วนปลายคาร์บอกซีเป็นส่วนที่ยื่นเข้าไปภายในถุง^{47,49,50}

HPC-1/syntaxin เป็นโปรตีนที่พบอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่จะมีการหลั่ง

สารสื่อประสาท ซึ่ง HPC-1/syntaxin มีส่วนของปลายคาร์บอกซีขนาดสั้นๆยื่นออกนอกเซลล์ และปลายแอมิโน ซึ่งมีโครงสร้างทุติยภูมิส่วนหนึ่งเป็นลักษณะ α -helices และอีกส่วนหนึ่งเป็น coiled-coil-forming heptad repeats อยู่ภายในไซโทพลาซึม^{47,51,52}

เมื่อมีการกระตุ้นเซลล์ประสาท จะเกิดการรวมตัวของโครงสร้าง SNARE complex ซึ่ง 1 หน่วยของ SNARE complex ประกอบด้วย SNAP-25 1 โมเลกุล HPC-1/syntaxin 1 โมเลกุล และ VAMP/synaptobrevin 2 โมเลกุล โดย SNAP-25 กับ HPC-1/syntaxin เมื่อรวมตัวกันจะมีโครงสร้างเป็นเส้น ลักษณะเกลียว 3 เส้นพันกัน และทำงานร่วมกันในการจับกับโปรตีน VAMP/synaptobrevin^{47,54} เพื่อดึงถุงสารสื่อประสาท เมื่อถุงสารสื่อประสาทมาชนผนังเซลล์แล้ว โครงสร้าง SNARE complex จะทำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างเยื่อหุ้มถุงสารสื่อประสาทกับเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้สารสื่อประสาทที่อยู่ภายในถุงเกิดการแพร่กระจายออกสู่นอกเซลล์ (ดังแสดงในรูปที่ 2 ก)

การตัดย่อยโปรตีน SNARE โดย light chain ของทอกซินโบทูลินัม

กลไกและขั้นตอนที่ light chain ของทอกซินโบทูลินัมทำการตัดย่อยโปรตีน SNARE อย่างจำเพาะนั้น เริ่มจาก light chain เข้ามาจับกับบริเวณจำเพาะที่ประกอบด้วยกรดแอมิโน 9 ตัว เรียกว่า SNARE secondary recognition motif (SSR motif) หลังจากนั้น light chain ของทอกซินโบทูลินัมจึงจะสามารถย่อยพันธะเปปไทด์ที่อยู่นอกบริเวณ SSR motif นั้น จำนวน SSR motif ภายในโปรตีน SNARE แต่ละชนิดมีจำนวนแตกต่างกันซึ่งโปรตีน VAMP/synaptobrevin และ HPC-1/syntaxin มี SSR motif อยู่ 2 ตำแหน่ง ส่วน SNAP-25 มี SSR motif อยู่ 4 ตำแหน่ง^{55,56,57} การศึกษาโดยใช้เปปไทด์ขนาด 9 กรดแอมิโนที่มีลำดับกรดแอมิโนแบบ SSR motif พบว่าสามารถขัดขวางการออกฤทธิ์ของทอกซินโบทูลินัมได้ แสดงว่า SSR motif นี้มีบทบาทในการออกฤทธิ์ของ light chain ของทอกซินโบทูลินัมกับโปรตีนเป้าหมาย

การตัดย่อยโดย light chain ของทอกซินโบ툴ินัมนั้นยังมีความจำเพาะต่อโปรตีน SNARE ตามชนิดของทอกซินด้วย โดยทอกซินชนิด A และชนิด E สามารถย่อยโปรตีน SNAP-25 บริเวณปลายด้านคาร์บอกซี^{58,59} ส่วนทอกซินชนิด B, D, F และ G สามารถย่อย VAMP/synaptobrevin^{34,60,61,62} ส่วนทอกซินชนิด C สามารถย่อยโปรตีน HPC - 1/syntaxin^{63,64} และโปรตีน SNAP-25⁶⁵ ผลการย่อยโปรตีน SNARE ดังกล่าวจะทำให้สารสื่อประสาทไม่สามารถหลั่งออกจากเซลล์ประสาทได้ (ดังแสดงในรูปที่ 2 ข)

บทสรุป

บทความนี้ได้ทบทวนความรู้ทางชีววิทยาในระดับโมเลกุลของทอกซินโบ툴ินัม โดยได้กล่าวถึง แบคทีเรียที่สามารถสร้างทอกซินนี้ ลักษณะทางพันธุกรรมที่กำหนดและลักษณะโปรตีน รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งต้องอาศัยการจับอย่างจำเพาะที่ผิวเซลล์ประสาทการนำทอกซินเข้าสู่เซลล์ และฤทธิ์ของทอกซินในการย่อยโปรตีน SNARE ที่ทำหน้าที่ในการหลั่งสารสื่อประสาท ความรู้เหล่านี้ เป็นพื้นฐานให้เกิดความเข้าใจการเป็นพิษต่อระบบประสาทของทอกซินโบ툴ินัม และสำหรับผู้สนใจสามารถศึกษาเพิ่มเติม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำทอกซินไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในการรักษาผู้ที่มีความผิดปกติบางประเภทของการกระตุ้นกล้ามเนื้อ และประโยชน์ในด้านความสวยงาม ซึ่งเป็นผลมาจากการมีความรู้ความเข้าใจทอกซินโบ툴ินัมที่ชัดเจนขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิกทุกท่าน และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง รศ.อรุณลักษณ์ อุติตานนท์ และ ผศ. อรุณวดี ชนะวงศ์ สำหรับคำแนะนำและความคิดเห็นที่สำคัญในการเรียบเรียงบทความนี้

เอกสารอ้างอิง

- Gill DM. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. Microbiol Rev 1982; 46:86-94.
- Middlebrook JL. Production of vaccines against leading biowarfare toxins can utilize DNA scientific technology. Adv Drug Deliv Rev 2005; 57:1415-23.
- Gimenez DF, Gimenez JA. The typing of botulinum neurotoxins. Int J Food Microbiol 1995; 27:1-9.
- Hatheway CL, Ferreira JL. Detection and identification of *Clostridium botulinum* neurotoxins. Adv Exp Med Biol 1996; 391:481-98.
- Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. Emerg Infect Dis 2005; 11:1578-83.
- Woodruff BA, Griffin PM, McCroskey LM, Smart JF, Wainwright RB, Bryant RG, et al. Clinical and laboratory comparison of botulism from toxin types A, B, and E in the United States, 1975-1988. J Infect Dis 1992; 166:1281-6.
- Foran PG, Mohammed N, Lisk GO, Nagwaney S, Lawrence GW, Johnson E, et al. Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E, and F compared with the long lasting type A. Basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. J Biol Chem 2003; 278:1363-71.
- Gimenez JA, Gimenez MA, DasGupta BR. Characterization of the neurotoxin isolated from a *Clostridium baratii* strain implicated in infant botulism. Infect Immun 1992; 60:518-22.
- Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Genetic confirmation of identities of neurotoxicogenic *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* implicated as agents of infant botulism. J Clin Microbiol 1988; 26:2191-2.

- 10 McCroskey LM, Hatheway CL, Fenicia L, Pasolini B, Aureli P. Characterization of an organism that produces type E botulin toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. J Clin Microbiol 1986; 23:201-2.
- 11 Wang X, Maegawa T, Karasawa T, Kozaki S, Tsukamoto K, Gyobu Y, et al. Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. Appl Environ Microbiol 2000; 66:4992-7.
- 12 Altwegg M, Hatheway CL. Multilocus enzyme electrophoresis of *Clostridium argentinense* (*Clostridium botulinum* toxin type G) and phenotypically similar asaccharolytic clostridia. J Clin Microbiol 1988; 26:2447-9.
- 13 Campbell K, Collins MD, East AK. Nucleotide sequence of the gene coding for *Clostridium botulinum* (*Clostridium argentinense*) type G neurotoxin: genealogical comparison with other clostridial neurotoxins. Biochim Biophys Acta 1993; 1216:487-91.
- 14 Luquez C, Bianco MI, de Jong LIT, Sagua MD, Arenas GN, Ciccarelli AS, et al. Distribution of botulinum toxin-producing clostridia in soils of Argentina. Appl Environ Microbiol 2005; 71:4137-9.
- 15 Franciosa G, Fenicia L, Pourshaban M, Aureli P. Recovery of a strain of *Clostridium botulinum* producing both neurotoxin A and neurotoxin B from canned macrobiotic food. Appl Environ Microbiol 1997; 63:1148-50.
- 16 Franciosa G, Ferreira JL, Hatheway CL. Detection of type A, B, and E botulism neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms. J Clin Microbiol 1994; 32:1911-7.
- 17 Kirma N, Ferreira JL, Baumstark BR. Characterization of six type A strains of *Clostridium botulinum* that contain type B toxin gene sequences. FEMS Microbiol Lett 2004; 231:159-64.
- 18 Barash JR, Arnon SS. Dual toxin-producing strain of *Clostridium botulinum* type Bf isolated from a California patient with infant botulism. J Clin Microbiol 2004; 42:1713-5.
- 19 Fujii N, Kimura K, Murakami T, Indoh T, Yashiki T, Tsuzuki K, et al. The nucleotide and deduced amino acid sequences of EcoRI fragment containing the 5'-terminal region of *Clostridium botulinum* type E toxin gene cloned from Mashike, Iwanai and Otaru strains. Microbiol Immunol 1990; 34:1041-7.
- 20 Hauser D, Gibert M, Boquet P, Popoff MR. Plasmid localization of a type E botulin neurotoxin gene homologue in toxigenic *Clostridium butyricum* strains, and absence of this gene in non-toxigenic *C. butyricum* strains. FEMS Microbiol Lett 1992; 78:251-5.
- 21 Kimura K, Fujii N, Tsuzuki K, Murakami T, Indoh T, Yokosawa N, et al. The complete nucleotide sequence of the gene coding for botulinum type C1 toxin in the C-ST phage genome. Biochem Biophys Res Commun 1990; 171:1304-11.
- 22 Fujii N, Oguma K, Yokosawa N, Kimura K, Tsuzuki K. Characterization of bacteriophage nucleic acids obtained from *Clostridium botulinum* types C and D. Appl Environ Microbiol 1988; 54:69-73.
- 23 Sunagawa H, Ohyama T, Watanabe T, Inoue K. 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 1992; 54:905-13.
- 24 Eklund MW, Poysky FT, Mseitif LM, Strom MS. Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G. Appl Environ Microbiol 1988; 54:1405-8.

- 25 Dineen SS, Bradshaw M, Johnson EA. Neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type A strains: sequence comparison and evolutionary implications. *Curr Microbiol* 2003; 46:345-2.
- 26 Zhang L, Lin WJ, Li S, Aoki KR. Complete DNA sequences of the botulinum neurotoxin complex of *Clostridium botulinum* type A-Hall (Allergan) strain. *Gene* 2003; 315:21-32.
- 27 Whelan SM, Elmore MJ, Bodsworth NJ, Brehm JK, Atkinson T, Minton NP. Molecular cloning of the *Clostridium botulinum* structural gene encoding the type B neurotoxin and determination of its entire nucleotide sequence. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58:2345-54.
- 28 Whelan SM, Elmore MJ, Bodsworth NJ, Atkinson T, Minton NP. The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type-E neurotoxin, derived by nucleotide-sequence analysis of the encoding gene. *Eur J Biochem* 1992; 204:657-67.
- 29 Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44:167-93.
- 30 Lalli G, Herreros J, Osborne SL, Montecucco C, Rossetto O, Schiavo G. Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J Cell Sci* 1999; 112 :2715-24.
- 31 Schiavo G, Rossetto O, Benfenati F, Poulain B, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 710:65-75.
- 32 Grumelli C, Verderio C, Pozzi D, Rossetto O, Montecucco C, Matteoli M. Internalization and mechanism of action of clostridial toxins in neurons. *Neurotoxicology* 2005; 26:761-7.
- 33 Rummel A, Mahrhold S, Bigalke H, Binz T. The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol* 2004; 51:631-43.
- 34 Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 2000; 80:717-66.
- 35 Li L, Singh BR. Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. *J Nat Toxins* 1998; 7:215-26.
- 36 Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sato K, et al. The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett* 1996; 378:253-7.
- 37 Coffield JA, Bakry N, Zhang RD, Carlson J, Gomella LG, Simpson LL. In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280:1489-98.
- 38 Black JD, Dolly JO. Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J Cell Biol* 1986; 103:521-34.
- 39 Black JD, Dolly JO. Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 1986; 103:535-44.
- 40 Hoch DH, Romero-Mira M, Ehrlich BE, Finkelstein A, DasGupta BR, Simpson LL. Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:1692-6.

- 41 Donovan JJ, Middlebrook JL. Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes. *Biochemistry* 1986; 25:2872-6.
- 42 Oblatt-Montal M, Yamazaki M, Nelson R, Montal M. Formation of ion channels in lipid bilayers by a peptide with the predicted transmembrane sequence of botulinum neurotoxin A. *Protein Sci* 1995; 4:1490-7.
- 43 Schmid MF, Robinson JP, DasGupta BR. Direct visualization of botulinum neurotoxin-induced channels in phospholipid vesicles. *Nature* 1993; 364:827-30.
- 44 Koriazova LK, Montal M. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol* 2003; 10:13-8.
- 45 Betz WJ, Angleson JK. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:347-63.
- 46 Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27:509-47.
- 47 Montecucco C, Schiavo G, Pantano S. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem Sci* 2005; 30:367-72.
- 48 Zinsmaier KE, Bronk P. Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis. *Biochem Pharmacol* 2001; 62:1-11.
- 49 Cornille F, Deloye F, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Poulain B. Inhibition of neurotransmitter release by synthetic proline-rich peptides shows that the N-terminal domain of vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin is critical for neuro-exocytosis. *J Biol Chem* 1995; 270:16826-32.
- 50 Yamasaki S, Baumeister A, Binz T, Blasi J, Link E, Cornille F, et al. Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinum neurotoxins and tetanus toxin. *J Biol Chem* 1994; 269:12764-72.
- 51 Fernandez I, Ubach J, Dulubova I, Zhang X, Sudhof TC, Rizo J. Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* 1998; 94:841-9.
- 52 Misura KM, Scheller RH, Weis WI. Self-association of the H3 region of syntaxin 1A. Implications for intermediates in SNARE complex assembly. *J Biol Chem* 2001; 276:13273-82.
- 53 Veit M, Sollner TH, Rothman JE. Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Lett* 1996; 385:119-23.
- 54 Canaves JM, Montal M. Assembly of a ternary complex by the predicted minimal coiled-coil-forming domains of syntaxin, SNAP-25, and synaptobrevin. A circular dichroism study. *J Biol Chem* 1998; 273:34214-21.
- 55 Pellizzari R, Rossetto O, Lozzi L, Giovedi S, Johnson E, Shone CC, et al. Structural determinants of the specificity for synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins. *J Biol Chem* 1996; 271:20353-8.
- 56 Pellizzari R, Mason S, Shone CC, Montecucco C. The interaction of synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin with botulinum neurotoxins D and F. *FEBS Lett* 1997; 409:339-42.
- 57 Washbourne P, Pellizzari R, Baldini G, Wilson MC, Montecucco C. Botulinum neurotoxin types A and E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. *FEBS Lett* 1997; 418:1-5.
- 58 Binz T, Blasi J, Yamasaki S, Baumeister A, Link E, Sudhof TC, et al. Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J Biol Chem* 1994; 269:1617-20.
- 59 Schiavo G, Santucci A, DasGupta BR, Mehta PP, Jontes J, Benfenati F, et al. Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett* 1993; 335:99-103.

- 60 Schiavo G, Shone CC, Rossetto O, Alexander FC, Montecucco C. Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J Biol Chem* 1993; 268:11516-9.
- 61 Schiavo G, Malizio C, Trimble WS, Polverino dL, Milan G, Sugiyama H, et al. Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J Biol Chem* 1994; 269:20213-6.
- 62 Yamasaki S, Hu Y, Binz T, Kalkuhl A, Kurazono H, Tamura T, et al. Synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) of *Aplysia californica*: structure and proteolysis by tetanus toxin and botulin neurotoxins type D and F. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:4688-92.
- 63 Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* 1993; 12:4821-8.
- 64 Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, Scheller RH, Montecucco C. Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* 1995; 270:10566-70.
- 65 Williamson LC, Halpern JL, Montecucco C, Brown JE, Neale EA. Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J Biol Chem* 1996; 271:7694-9.