様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年　6 月　3 日現在

研究種目：　基盤研究（Ｃ）
研究期間：　2007～2008
課題番号：　19580360
研究課題名（和文）ボツリヌスＣ・Ｄモザイク神経毒素の持つ特異構造の解析と診断法の開発

研究課題名（英文）Analysis of specific structure of *Clostridium botulinum* C・D mosaic neurotoxins and the development of their detection methods
研究代表者
　小崎　俊司（　KOZAKI SHUNJI　）
　大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
　研究者番号：　10109895

研究成果の概要：鳥類や家畜のボツリヌス症由来菌の産生する「C・D モザイク」毒素の特徴について、毒性と抗原性状を典型的な C 型および D 型神経毒素と比較することにより明らかにした。特に最近、本邦で散発的に発生している牛ボツリヌス症由来菌について疫学的解析を行うとともに毒素の免疫学的手法を用いた迅速な特異検出方法の確立を試みた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学
科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学
キーワード：ボツリヌス症、ボツリヌス毒素、受容体、診断法、イムノクロマト

１．研究開始当初の背景

ボツリヌス菌の産生する神経毒素（A～G；分子量150kDa）はヒトに対する食中毒ばかりでなくウシ・ウマなどの哺乳動物および鳥類のボツリヌス症の病原因子として知られている。ヒトのボツリヌス中毒は主としてA、B、E、F型菌で起こり、C、D型菌は鳥類や家畜のボツリヌス症の原因菌となっている。神経毒素は標的部位である神経細胞に存在する受容体に結合し、細胞内侵入・移行を経て細胞内で毒性発現を担う3つの機能的なドメイン構造（L、H_N，H_C）を持つ。神経毒素の軽鎖（L;50kDa）は亜鉛依存性蛋白分解酵素の活性を持ち、毒素型特異的にシナプス小胞と前膜との融合に関与するSNARE蛋白（シナプトブレビン、シンタキシン、SNAP-25）の一つを特異的に分解することで神経伝達物質の遊離を阻害する。神経毒素を構成するもう一方の成分である重鎖（H;100kDa）のN末端領域（H_N）は毒素型間でも比較的相同性が高く、毒素の細胞内移行を

担っていると考えられている。重鎖C末端領域（H_C）は毒素型間で相同性が最も低く、型特異的な受容体への結合を担っている。自然界で最も高い毒性を有するボツリヌス毒素は、その神経に対する特異的作用から神経化学領域では常に注目されている蛋白毒素であり、神経伝達物質の遊離に直接関与することから試薬としての利用価値も高い。神経に対する作用の特異性を決定するボツリヌス毒素受容体の研究は、報告者らが世界的に牽引役となって進めており、これまで実証したB型毒素受容体の性状から毒作用は神経活動と密接に連動し、シナプス小胞のリサイクリングにより毒素が細胞内に取り込まれることが明らかになった。さらに最近、報告者らはC型毒素受容体がガングリオシドGT1b、GD1bであり、D型毒素受容体にフォスファチジルエタノールアミン(PE)が関与していることを明らかにした。これら毒作用における分子生物学的知見が集積される一方、毒素型と疾病との基本的な基盤は十分解決をされているとは言えない。

鳥類ボツリヌス症はC型菌によるとされてきたが、報告者は種々の鳥類ボツリヌス症由来菌の神経毒素遺伝子を調べた結果、受容体結合を担うH_C領域がD型神経毒素と非常に類似した「C/Dモザイク」構造をもっていることがわかった。また、我が国ではこれまで発生が皆無であった牛ボツリヌス症が、昨年来多発し本症の分離菌の産生する毒素は中和試験の結果からD型抗毒素で中和される毒素が検出されたが、実際分離菌の持つ毒素遺伝子塩基配列を解析した結果、牛ボツリヌス症由来菌はすべてH_C領域がC型神経毒素に類似した「D/Cモザイク」構造を有し、鳥類ボツリヌス症由来菌の神経毒素遺伝子とは全く逆の構造を持つことがわかった。これまで、これら２つの「C・Dモザイク」毒素の存在は知られていたが、ボツリヌス症との関連性については全く調べられておらず、それらの毒性および抗原性状などの基礎的知見も乏しく、世界的に「C・Dモザイク」毒素の研究を進めているところはない。また、C、D型毒素間の相同性は他の型と比べて高く、毒素型間で最も免疫交差性が高いと考えられているが、鳥類および牛ボツリヌス症由来菌の持つ毒素遺伝子の性状から、原因菌が「C・Dモザイク」毒素を産生する可能性が高く、これがC、D型菌によるボツリヌス症の診断で混乱を生じさせていると考えられる。さらに、ボツリヌス毒素はバイオテロの対象毒素として注目され、吸引によるサルに対する致死活性はA、B、E、F型毒素と比べC、D型毒素は同程度の活性を有することから、ヒトに対する危害については型に差がないと考えられている。

２．研究の目的

本研究では「C・Dモザイク」神経毒素の分子構造と活性発現機構を典型的なC型およびD型神経毒素と比較しながら分子レベルで解析することで、動物・家禽ボツリヌス症の発症機序と特異な構造を持つ「モザイク」型毒素の特徴との関係を明らかにし、さらに各「C・Dモザイク」神経毒素の遺伝学的および免疫学的特異迅速検出法の確立を目指す。

３．研究の方法

（１）牛ボツリヌス症由来神経毒素の精製と抗原性および遺伝子の解析

既報のＣ型、C/ＤモザイクおよびＤ型神経毒素の精製方法を参考にしながら、複数の牛ボツリヌス症由来菌株から、毒素産生の高い菌株を選別し、D/Cモザイク神経毒素(BoNT/DC)を精製し、他の毒素と致死活性を比較した。トキソイド化したBoNT/DCをマウスおよびウサギに免疫し、モノクローナル(mAb)およびポリクローナル抗体(pAb)を作製し、特異抗原部位の検索を試みた。発生場

所が異なる分離菌5株の神経毒素遺伝子全長をPCRで増幅し、全塩基配列を決定するとともに、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)によるDNAの切断パターンを比較した。

（２）リコンビナント重鎖C末端(H_C)領域と受容体分子の相互作用の解析

C型およびD型のH_C領域のリコンビナント蛋白を調製し、結合活性を指標に受容体結合活性を指標に受容体結合部位に関わるアミノ酸の同定と表面プラズモン共鳴解析系を用いて受容体との相互作用を解析した。

（３）遺伝子学的および免疫学的特異検出法の確立

神経毒素の遺伝子配列からC型、D型およびC・Dモザイク毒素を識別するためのプライマーセットを設計した。牛ボツリヌス症由来菌の産生するBoNT/DCを特異的に検出するためのイムノクロマトキットのプロトタイプをmAbおよびpAbの組み合わせにより作製し、その有効性について調べた。

４．研究成果

（１）①牛ボツリヌス症由来菌から既報の方法に従い、分子量約50万の複合体毒素（L毒素）を得た。さらに高食塩濃度、アルカリ条件下でゲルろ過により神経毒素を精製した。この神経毒素は他型と比較して最も高い毒力を有していた（表１）。

表1. BoNT/DCおよび他の型のBoNTのマウス致死活性

type	strain	toxicity (ip LD_{50}/mg protein)
A	62A	1.1×10^8
B	Okra	1.2×10^8
C	CB-19	5.4×10^7
C/D	003-9	6.2×10^7
D	1873	2.8×10^8
D/C	OFD05	1.1×10^9

②mAbは培養上清からprotein Gカラムを用いてIgG分画に調製した。pAbは抗血清からIgG分画を調製し、BoNT/DC結合カラムを用いてアフィニティ抗体を精製した。さらにC,D型神経毒素に対するIgGを吸収し特異IgG(抗BoNT/DC特異IgG)を得た。C、D型およびBoNT/DCに対する反応性をブロティングで調べたところ、抗BoNT/DC特異IgGはBoNT/DCの重鎖のみに反応し、BoNT/DCの特異抗原決定基は重鎖に存在することがわかった（図1）。

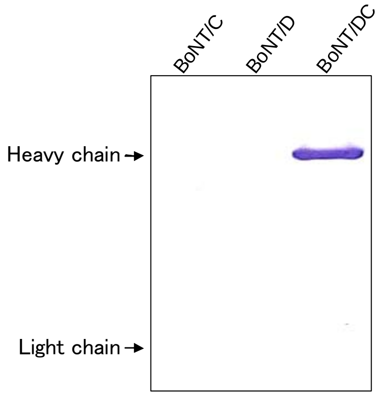

図1. 抗BoNT/DC 特異IgGの各型神経毒素に対する反応性

BoNT/DCを完全中和する抗体は抗BoNT/DC特異IgG と3種類の重鎖C末端領域を認識するmAbであった。BoNT/DCの中和活性に関与する特異的な抗原決定基は重鎖C末端領域に少なくとも3カ所存在することが明らかになった。

③発生場所が異なる分離菌5株の神経毒素遺伝子の全塩基配列を解析した結果、4株の塩基配列は一致していたが、D/Cモザイク神経毒素の標準株(South African)とは一部異なっていた。4株と比較してH_C領域に複数の変異が存在する残りの菌株はPFGEによる解析でも標準株と比較して最も低い相同性を示した（図2）。

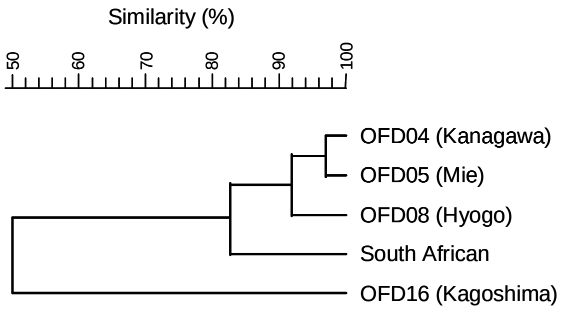

図2. D/Cモザイク神経毒素産生株のPFGEに基づくデンドログラム

（2）C 型 H_C は A 型および B 型の受容体結合にも関与すると考えられている W1257, Y1258, G1270 と C 型特異的に存在する H1282 が受容体であるガングリオシド GT1b への結合に関与していた。PE に対して親和性が異なる 2 種の D 型 H_C から種々のキメラ体、あるいは C 型と D 型のキメラ体を調製し、PE に対する結合活性および親和性を詳細に調べた。PE への結合に関与する H_C 領域は C 型のガングリオシド認識部位よりも上流にあり、その親和性を決定する部位に 2 つのリジン残基が関与していることがわかった。

（3）①神経毒素受容体の遺伝子配列から新たに設定した 4 種のプライマーセットを用いることにより、PCR で C 型、D 型および C・D モザイク毒素を識別することが可能になった（図 3）。

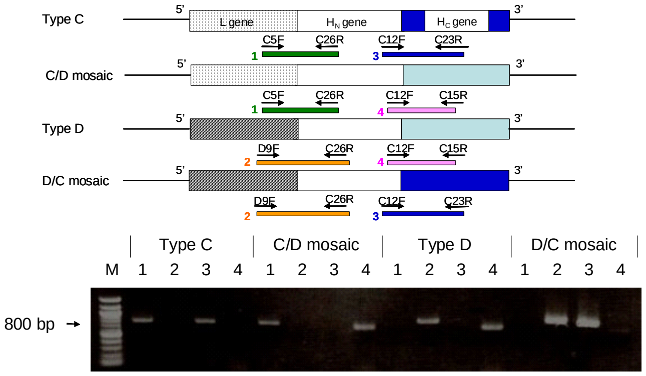

図3. PCRによるC型およびD型神経毒素遺伝子の識別

②2 種類の BoNT/DC に対する mAb の組み合わせで作製したイムノクロマトキットが最も高感度で BoNT/DC（100 LD_{50}/ml）を検出することができた。L 毒素の検出のために、BoNT/DC と同様に希釈液を pH6.2 で行うと感度は下がった。複合体毒素はアルカリ条件下で BoNT/DC と無毒成分に解離することから、pH8.0 で希釈を行ったところ、1,000 LD_{50}/ml の L 毒素が検出可能であった。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

①Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T. and Kozaki, S. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. Microb Pathog. 44, 484-493 (2008)、査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

① 中村 佳司、Characterization of *Clostridium botulinum* D/C mosaic neurotoxin associated with bovine botulism in Japan, IBRCC2008、2008年8月14日、アメリカ

②小崎 俊司、Pathogenicity of botulinum C・D mosaic toxins in animals, TOXINS2008、2008 年 6 月 13 日、イタリア

③幸田 知子、牛ボツリヌス症由来菌神経毒素に特異な抗原部位の検索と迅速診断法の確立、日本細菌学会関西支部、2007 年 11 月 10 日、大阪府

④中村 佳司、牛ボツリヌス症分離菌株産生毒素の性状解析、第 54 回毒素シンポジウム、2007 年 9 月 6 日、大阪府

⑤小崎 俊司、牛ボツリヌス症由来菌株の毒

素の性状と迅速診断法確立への試み、第143回日本獣医学会学術総会、2007年4月3日、茨城県

６．研究組織

(1)研究代表者

小崎　俊司 (KOZAKI SHUNJI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号： 10109895