

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790321

研究課題名 (和文)

ゲノム構造解析に基づいた E 型ボツリヌス毒素遺伝子の由来と伝達機構に関する研究

研究課題名 (英文)

Genome-based analysis for tracing the origin and transferring the botulinum neurotoxin gene in *Clostridium botulinum* type E

研究代表者

阪口 義彦 (SAKAGUCHI YOSHIHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70403491

研究成果の概要:ボツリヌス菌は産生する神経毒素の抗原性から、A～G 型に分類される。今回、E 型ボツリヌス毒素遺伝子の由来と伝達機構を明らかにする手がかりとして、C 型菌において C2 毒素遺伝子をコードするプラスミド (pC2C203U28) の解析を行った。本毒素は C2I と C2II からなる 2 成分毒素で、両者の共存下で生物活性を示す。本プラスミドの解析を進めることで、伝達機構の解明につながる可能性があると考え、C2 遺伝子の由来を明らかにすることを目的として、pC2C203U28 の全塩基配列を決定し、様々な特徴を明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：ボツリヌス菌，伝達機構，プラスミド，C2毒素遺伝子，ボツリヌス毒素遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌は世界で最も強力といわれている神経毒素を産生し、ヒトや家畜に強力な致死作用を示す。このため、生物兵器の対象として本毒素が挙げられている。また、本毒素は無毒成分と結合しているため、胃液や

腸液に強く、毒素型中毒を引き起こす。ボツリヌス菌はその抗原性の違いにより A～G 型に、A 型と B 型は A1～A4, B1～B3, bivalent B, bivalent (Ab, Ba, Bf 型) に分類される。近年、G 型菌の性状は他の菌とは異なるため、*Clostridium argentinense* という新種に独立

された。

A～F 型ボツリヌス菌は、1 種類以上のファージより感染（溶原化）されている。これらの菌型の中で、毒素遺伝子は C 型と D 型菌においてのみ宿主特異性バクテリオファージのゲノム上に存在し、A, B, E, F 型菌においては染色体上に、*C. argentiense* はプラスミド上にコードされている。興味深いことに、ボツリヌス菌以外のブチリカム菌は E 型ボツリヌス毒素と類似した神経毒素を産生し、乳児ボツリヌス症の原因菌とされてきたが、近年、本菌による食中毒事例も世界中（イタリア、中国など）で報告されている。以前に、我々は E 型ボツリヌス毒素とブチリカム菌の毒素遺伝子の塩基配列を比較したところ、アミノ酸レベルで 97% の相同性を示すこと、また、制限酵素未処理のゲノム DNA を PFGE（パルスフィールド電気泳動）後、E 型毒素遺伝子をプローブにしてサザンブロット解析を行い、毒素遺伝子はどちらの菌株においても染色体上に存在することを明らかとした。このことは、ボツリヌス毒素遺伝子がバクテリオファージまたはプラスミドを介してブチリカム菌に伝達され、宿主内で巨大プラスミドまたは insertion sequence (IS) を介してゲノム DNA 内に挿入された可能性が考えられる。一方、その他の菌として、A 型ボツリヌス菌とスプロゲネス菌、C 型、D 型ボツリヌス菌とノビイ菌においては、毒素産生性以外の性状は非常に類似していることが報告されていた。また、バラチ菌においても F 型ボツリヌス毒素を産生し、乳児ボツリヌス症を起こす事例も報告されている。

2. 研究の目的

最近、A, B, F 型菌の全ゲノム塩基配列が報告された。現在、Bf, C, D, E 型菌のゲノム配列の決定が進められている。これらの中

で、A3, B1, Ba4 型菌はプラスミド上に毒素遺伝子がコードされている。E 型ボツリヌス毒素遺伝子の由来と伝達機構を明らかにする手がかりとして、今回、C 型と D 型菌が産生する C2 毒素 (C2) をコードする遺伝子がプラスミドに局在している可能性を示唆する結果を得た。本毒素は C2I と C2II からなる 2 成分毒素で、両者の共存下で生物活性を示す。本プラスミドの解析を進めることで、伝達機構の解明につながる可能性があると考え、C2 遺伝子の由来を明らかにすることを目的として、C 型菌プラスミド (pC2C203U28) の全塩基配列を決定し、本ゲノムの様々な特徴を明らかとした。

3. 研究の方法

(1) PFGE とサザンブロット解析

C 型と D 型ボツリヌス菌をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 用プラグに包埋し、塩化リゾチウムとプロテアーゼ処理することによって、全ゲノム DNA を調整した。作成したプラグの PFGE を行い、分離した DNA について *c2I* または *c2II* をプローブとして、サザンハイブリダイゼーション解析を行った。

(2) プラスミドの全塩基配列の決定

C 型無毒株 (C203U28 株) からゲノム DNA を精製し、*AcI* I または *Bgl* II, *Bsp*106 I, *Bsp*H I, *Bsr*G I, *Eco*R I, *Mfe* I, *Nsi* I, *Pci* I, *Spe* I で消化後、セルフライゲーションにより環状化させ、それぞれの環状化 DNA を PCR の鋳型とした。作成した鋳型 DNA を用いて、既知の C2 遺伝子配列を基にプライマー対を作成し、インバース PCR (IPCR) を行った。得られた PCR 産物の配列をプライマーウォーキング法により、DNA シークエンサー (Applied Biosystem) を用いて、シークエンス解析を行った。得られた配列を

SEQUENCHER DNA sequencing software (Gene Codes)により編集し、多数の配列断片をアセンブラーで結合編集させた。

(3) アノテーション解析

プラスミド上のそれぞれの Potential protein-coding regions (ORF) を *In Silico* MolecularCloning (IMC) software により確定した。得られた ORF と種々の生物における既知のアミノ酸配列の相同性を公共のデータベース (DDBJ : <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.htm> 1)) に対して BLASTP などにより、配列の相同検索を行った。

(4) PCR スキャニング解析

他の C 型と D 型有毒株の C-Stockholm 株, C-468 株, D-1873 株, D-4947 株, C 型無毒株の (C)-A02 株のゲノム DNA を精製し、それぞれのゲノム DNA を PCR の鋳型として用いた。C-Stockholm 株, C-468 株, D-1873 株は C2 を産生するが、(C)-A02 株と D-4947 株は C2 を産生しない。

プライマーは、配列決定した (C)-203U28 株のプラスミド (pC2C203U28) の塩基配列を基に作成したものをを用いた。それぞれの鋳型 DNA とプライマー対を用いて、本プラスミド上のそれぞれの遺伝子について、各菌株の PCR を行い、遺伝子の有無を調べた。

4. 研究成果

pC2C203U28 の全塩基配列は、106,981bp の環状 2 本鎖 DNA で、GC 含量は 26.7%であった。本プラスミド上には、C2 を含む 123 個のタンパク質をコードする領域 (ORF) を同定したが、tRNA 遺伝子は存在していなかった。また、核酸代謝に関与する多数の遺伝子が存在し、その並びが保存されていた。さらに、3 つの RNA polymerase s 因子が存在し、い

れも s⁷⁰ ファミリーの extracytoplasmic function (ECF) s 因子のグループに属していた。一方、本プラスミド上には、新しいタイプの insertion sequence (IS) とその残骸が存在し、IS としての構造を確定することができた。

他の C 型 (C-Stockholm 株と C-468 株) と D 型菌 (D-1873 株) について、プラスミド上の各遺伝子が保存されているかを調べるため、PCR スキャニング解析を行った。C 型と D 型菌とも C2 遺伝子を含む下流領域 (70kb) においては、ほとんどの遺伝子が保存されていたが、C2 遺伝子の上流領域 (35kb) では、C 型菌のみ保存されていない遺伝子が多かった。そこで、C 型と D 型菌のプラスミドの構造を比較するため、その上流領域の塩基配列の決定を行ったところ、C 型と D 型菌とも、非常にゲノム構造のバリエーションが認められた。

現在、G 型毒素遺伝子をコードするプラスミドの全塩基配列の決定も進めている。本プラスミドのサイズは、PFGE (パルスフィールド電気泳動) から、約 140kb である。既知の毒素遺伝子を基に、インバース PCR により配列決定を進め、約 100kb の配列が決定できた。今後、残りのギャップ領域の配列決定を行い、本プラスミドの種々の特徴を明らかとし、毒素遺伝子の伝達機構 (ファージ変換や接合伝達を含む) を解明することで、分類学上の混乱も解消されることが大いに期待される。

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 3 件)

① Sakaguchi Y, Hayashi T, Yamamoto Y, Nakayama K, Zhang K, Ma S, Arimitsu H,

Oguma K. Molecular analysis of an extrachromosomal element encoding the C2 toxin gene discovered in *Clostridium botulinum* type C. J. Bacteriol., in press, 2009, 査読有.

② 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., 45(2), 142-149, 2008, 査読有.

③ Lee JC, Hwang HJ, Sakaguchi Y, Yamamoto Y, Arimitsu H, Tsuji T, Watanabe T, Ohyama T, Tsuchiya T, Oguma K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine. Microbiol. Immunol., 51(4), 445-455, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 6 件)

① 阪口義彦, 林 哲也, 山本由弥子, 中山恵介, 馬 少博, 橋本夕佳, 張 凱, 小熊恵二, C型とD型ボツリヌスC2毒素遺伝子をコードするプラスミドの解析, 第82回日本細菌学会総会, 平成21年3月12日-14日, 名古屋国際会議場 (名古屋)

② 高橋千尋, 永浜政博, 青柳晃平, 小林敬子, 小田真隆, 小熊恵二, 阪口義彦, 櫻井純, ボツリヌス菌C2毒素の細胞内侵入におけるPI3K/Aktシグナル伝達系の役割, 第82回日本細菌学会総会, 平成21年3月12日-14日, 名古屋国際会議場 (名古屋)

③ 阪口義彦, 林 哲也, 中山恵介, 山本由弥子, 馬 少博, 橋本夕佳, 張 凱, 小熊恵二, C型とD型ボツリヌスC2毒素遺伝子をコードするプラスミドの解析, BMB (Biochemistry and Molecular Biology) 2008, 第31回日本

分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会、合同大会, 平成20年12月9日-12日, 神戸ポートアイランド (神戸)

④ 阪口義彦, 小田真隆, 永浜政博, 小林敬子, 山本由弥子, 馬 少博, 橋本夕佳, 張 凱, 唐澤忠宏, 櫻井 純, 小熊恵二, C型とD型ボツリヌス菌の産生するホスホリパーゼCの酵素活性と生物活性, 第61回日本細菌学会中国・四国支部総会, 平成20年10月18日-19日, 愛媛大学城北キャンパス (愛媛)

⑤ 阪口義彦, 林 哲也, 山本由弥子, 清水健太, 小西里枝, 藤本夕紀子, 馬 少博, 橋本夕佳, 小熊恵二, C型とD型ボツリヌスC2毒素遺伝子をコードするプラスミドの解析, 第81回日本細菌学会総会, 平成20年3月24日-26日, 国立京都国際会館 (京都)

⑥ 小西里枝, 山本由弥子, 橋本夕佳, 馬 少博, 清水健太, 阪口義彦, 武士甲一, 長町榮子, 小熊恵二, ボツリヌス神経毒素検出イムノクロマト法の開発, 第81回日本細菌学会総会, 平成20年3月24日-26日, 国立京都国際会館 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 義彦 (SAKAGUCHI YOSHIHIKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 70403491

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし