

称号及び氏名	博士（獣医学）	趙 海洋
学位授与の日付	平成24年3月31日	
論文名	ボツリヌス A 型神経毒素に対する抗体を利用した複合体毒素の構造解析	
論文審査委員	主査	小崎 俊司
	副査	山崎 伸二
	副査	三宅 眞実
	副査	向本 雅郁

論文要旨

はじめに

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は耐熱性芽胞を形成する偏性嫌気性グラム陽性桿菌である。本菌は産生する神経毒素 (BoNT) の抗原性により A~G の 7 型に分類され、A、B、E、F 型はヒト、C、D 型は家禽、家畜のボツリヌス症を引き起こす。ボツリヌス毒素は BoNT に無毒成分が結合した複合体の形で産生され、分子量の違いにより、LL 毒素、L 毒素および M 毒素に分けられる。M 毒素は BoNT と血球凝集活性を持たない無毒成分 (Non-toxic non-hemagglutinin, NTNH) から構成され、L 毒素は BoNT、NTNH および血球凝集活性を持つヘマグルチニン (Hemagglutinin, HA) から構成される。HA には 3 つのサブコンポーネントが存在し、それぞれ HA1、HA2、HA3 と呼ばれている。LL 毒素は L 毒素の二量体である。複合体毒素は弱アルカリ性条件下で無毒成分と神経毒素に解離する。BoNT はジスルフィド結合で結ばれた約 50 kDa の軽鎖と約 100 kDa の重鎖の二本鎖構造であり、軽鎖と重鎖 N 末端領域 (HN) および重鎖 C 末端領域 (HC) の 3 つの機能的ドメインに分かれる。BoNT は神経筋接合部位に作用し、神経伝達物質の遊離を阻害することにより麻痺を引き起こす。

A、B、E 型 BoNT にはボツリヌス神経毒素遺伝子の違いにより複数のサブタイプが存在する。A 型 BoNT (BoNT/A) は現在 5 種類のサブタイプ (BoNT/A1~A5) に分類

され、ほとんどの株が A1 もしくは A2 に属する。A1 サブタイプは 3 種類の毒素 (LL、L、M)、A2 サブタイプは M 毒素のみを産生する。BoNT/A1 と BoNT/A2 は塩基配列の違いから遺伝学的診断が可能であるが、それぞれの特異抗体がないため免疫学的診断法は確立されていない。

近年、BoNT と HA1・HA2 複合体の結晶構造および電子顕微鏡像により D 型複合体毒素立体構造のモデルが報告されている。また、HA3 の結晶構造も解明されたが、NTNH の結晶構造が解析されていないため、BoNT と無毒成分との結合様式については、十分に理解されていない。

一般に、細菌毒素に対する抗体の研究は毒素をホルマリンで無毒化したトキシイドで免疫し、作製した抗体を用いて行われている。しかし、トキシイド化により毒素の立体構造に変化が生じ、毒素の本来保有している抗原性が完全に保持されているとは限らない。本研究では BoNT/A1 および BoNT/A2 の各トキシイドで基礎免疫したマウスに、それぞれの BoNT を複数回追加免疫し、BoNT 特異的モノクローナル抗体 (mAb) を作製した。さらに各 mAb の性状を調べ、A1 および A2 サブタイプの免疫学的診断に利用可能な mAb を検索した。得られた mAb を用いて複合体毒素との反応性を調べ、BoNT と無毒成分との結合状態を調べることを目的とした。

第 1 章 モノクローナル抗体の調製

BoNT/A1 および BoNT/A2 の各トキシイドでマウスを基礎免疫した後、それぞれの BoNT で複数回追加免疫し、常法により mAb を調製した。BoNT/A1 に対し 51 クローン、BoNT/A2 に対し 25 クローンの mAb を得た。各 mAb を精製し、イムノブロットイングにより認識ドメインを調べた。重鎖に反応するが、HC と反応しない mAb を HN 認識抗体とした。競合 ELISA により BoNT/A1 に対する mAb (mAb-A1) 8 種類、BoNT/A2 に対する mAb (mAb-A2) 7 種類の認識部位が異なる抗体が得られた。すべての抗体は IgG1 または IgG2a のサブタイプに属した。各 mAb の BoNT およびトキシイドとの反応性を ELISA で調べた。軽鎖および H_N を認識する抗体はすべて BoNT およびトキシイドと反応した。mAb-A1 の 2 種類の H_C 認識抗体 (4E4、9A3) は BoNT/A1 と反応するが、トキシイドと反応しなかった。mAb-A2 の 1 種類の H_C 認識抗体 (5C7) は BoNT/A2 と反応するが、トキシイドと反応しなかった。BoNT と反応するが、トキシイドとは反応しなかった抗体 (4E4、9A3、5C7) はすべて H_C を認識することから、ホルマリン処理により H_C の抗原性が部分的に消失することが示唆された。各ハイブリドマから全 RNA を調製し、RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) により cDNA を調製した。この cDNA を鋳型として、抗体の可変領域 DNA フラグメントを PCR (Polymerase chain reaction) により増幅した。PCR 産物を精製後、塩基配列を調べ、BLAST (For Ig sequence, NCBI) でアミノ酸配列を決定した。いずれの mAb の重鎖可変領域 (VH 領域) においてもアミノ酸配列が一致するものはなかったことから、各 mAb は異なるクロー

ンであることがわかった。一方、軽鎖可変領域 (VL 領域) では同一の配列を有する mAb が多数存在することから、BoNT への結合に対しては、VH 領域が重要な役割を担うと考えられた。

第2章 モノクローナル抗体の BoNT との反応性

得られた mAb の BoNT/A1 および BoNT/A2 に対する反応性を ELISA で調べた。8 種類の mAb-A1 では、3 種類 (10H3、4E4、9A3) が BoNT/A1 に特異的に反応した。他の 5 種類 (1D4、1E2、1B12、1F11、6D9) は BoNT/A2 にも反応した。7 種類の mAb-A2 では、3 種類 (3B10、5G2、6A5) が BoNT/A2 に特異的に反応した。他の 4 種類 (2A12、4G12、5C7、9B3) は BoNT/A1 にも反応した。

各 mAb の BoNT/A1、BoNT/A2 の中和活性をマウス腹腔内投与法により調べた。BoNT/A1 および BoNT/A2 を構成する各ドメインそれぞれを認識する中和抗体も得られたことから、各ドメインに毒素中和に関わるエピトープが存在することがわかった。中和抗体は主に抗原とした毒素のみを中和したが、1E2 は BoNT/A1 および BoNT/A2 を共に中和した。これは両毒素間で共通するエピトープも毒素活性に関わっていることを示している。

BoNT/A1 および BoNT/A2 と各 mAb の平衡解離定数 (equilibrium dissociation constant, K_D) を表面プラズモン共鳴により測定した。MAb-A1 の軽鎖認識抗体(1D4、1E2)は両毒素と同程度の K_D 値を示した。5 種類の両サブタイプの BoNT に反応する抗体 (1B12、1F11、4G12、9B3、5C7) では各毒素に対して異なる K_D 値を示した。

第3章 モノクローナル抗体を利用した複合体毒素の構造解析

BoNT を構成する各ドメインと無毒成分との結合状態を調べるため、各ドメインを認識する mAb と複合体毒素 (M および L 毒素) との結合を免疫沈降法により調べた。複合体毒素の構造を保持させるため、すべての反応は pH 6.0 の弱酸性条件下で行った。Protein G-sepharose に結合した mAb を神経毒素および複合体毒素と反応後、沈降した毒素を BoNT/A1 に対するポリクローナル抗体を用いたイムノブロテイングにより検出した。軽鎖認識抗体では、両毒素に反応する抗体 (1D4、1E2、4G12、9B3) はすべての複合体毒素に反応した。また、A2 サブタイプを特異的に認識する抗体 (3B10) は A2 サブタイプ M 毒素に反応した。軽鎖認識抗体は複合体構造の有無に関わらず、BoNT に反応することから、これら抗体の認識部位は複合体毒素分子の表面に露出していると考えられた。HN 認識抗体では、両毒素に反応する抗体の中で、1F11 はすべての複合体毒素に反応したが、他の2つ (1B12、2A12) は反応しなかった。BoNT/A1 を特異的に認識する抗体 (10H3) と BoNT/A2 を特異的に認識する抗体 (5G2) は複合体毒素に反応しなかった。一部の HN 認識抗体は複合体毒素に反応しないことから、無毒成分が HN を部分的に覆い隠して、抗体の結合を阻害していることが示唆された。Hc 認識抗体

では、両毒素に反応する抗体（5C7、6D9）は M 毒素に反応したが、L 毒素には反応しなかった。BoNT/A1 を特異的に認識する抗体（4E4、9A3）は複合体毒素に反応しなかった。BoNT/A2 を特異的に認識する抗体（6A5）は M 毒素に結合した。従って、M 毒素の無毒成分（NTNH）は一部の Hc 抗体の認識部位を、L 毒素の無毒成分（NTNH と HA）はすべての Hc 抗体の認識部位を覆い隠していることが示唆された。

以上の結果から、BoNT/A1 と BoNT/A2 に反応する抗体は両サブタイプ M 毒素との反応性が一致したことから、両サブタイプの M 毒素では BoNT と NTNH との結合は同様の形態を保っていると考えられた。軽鎖部分は複合体毒素において分子表面に露出していると考えられた。

総括

1. BoNT に反応し、トキシイドには反応しない抗体はすべて H_c を認識することから、ホルマリン処理により H_c の抗原性が消失すると考えられた。
2. 同一の VL 領域を有する mAb が多数存在したことから、抗体の BoNT への結合は VH 領域が重要な役割を担うと考えられた。
3. BoNT/A1 および BoNT/A2 の各ドメインを認識する中和抗体が存在したことから、両毒素の各ドメインに毒素中和に関わるエピトープが存在することが示唆された。
4. 各ドメイン認識抗体と複合体毒素との反応性から、軽鎖部分は複合体毒素において分子表面に露出しており、重鎖部分が無毒成分との結合に関わっており、HA は H_c 部分をさらに覆う状態で NTNH と結合していると予想された。

審査結果の要旨

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は耐熱性芽胞を形成する偏性嫌気性グラム陽性桿菌である。本菌は産生する神経毒素 (BoNT) の抗原性により A~G の 7 型に分類されている。毒素は BoNT に無毒成分が結合した複合体の形で産生され、分子量の違いにより、LL 毒素、L 毒素および M 毒素に分けられる。M 毒素は BoNT と血球凝集活性を持たない無毒成分 (Non-toxic non-hemagglutinin, NTNH) から構成され、L 毒素は BoNT、NTNH および血球凝集活性を持つヘマグルチニン (Hemagglutinin, HA) から構成される。複合体毒素は弱アルカリ性条件下で無毒成分と神経毒素に解離する。BoNT はジスルフィド結合で結ばれた約 50 kDa の軽鎖と約 100 kDa の重鎖の二本鎖構造であり、軽鎖と重鎖 N 末端領域 (HN) および重鎖 C 末端領域 (HC) の 3 つの機能的ドメインに分かれる。A 型 BoNT (BoNT/A) は現在 5 種類のサブタイプ (BoNT/A1~A5) に分類され、ほとんどの株が A1 もしくは A2 に属する。A1 サブタイプは 3 種類の毒素 (LL、L、M)、A2 サブ

タイプはM毒素のみを産生する。BoNT/A1とBoNT/A2は塩基配列の違いから遺伝学的診断が可能であるが、それぞれの特異抗体がないため免疫学的診断法は確立されていない。近年、BoNTとHAの結晶構造が解明されたが、NTNHの結晶構造が解析されていないため、BoNTと無毒成分との結合様式については、十分に理解されていない。一般に、細菌毒素に対する抗体の研究は毒素をホルマリンで無毒化したトキシイドで免疫し、作製した抗体を用いて行われている。しかし、トキシイド化により毒素の立体構造に変化が生じ、毒素の本来保有している抗原性が完全に保持されているとは限らない。本研究ではBoNT/A1およびBoNT/A2の各トキシイドで基礎免疫したマウスに、それぞれのBoNTを複数回追加免疫し、BoNTに対する特異的モノクローナル抗体(mAb)を作製した。さらに各mAbの性状を調べ、A1およびA2サブタイプの免疫学的診断に利用可能なmAbを検索した。得られたmAbを用いて複合体毒素との反応性を調べ、BoNTと無毒成分との結合状態を調べることを目的とした。

第1章では、BoNT/A1に対するmAb(mAb-A1)8種類、BoNT/A2に対するmAb(mAb-A2)7種類の認識部位が異なる抗体を調製した。軽鎖およびH_Nを認識する抗体はすべてBoNTおよびトキシイドと反応したが、mAb-A1の2種類のH_C認識抗体はBoNT/A1とのみ反応した。mAb-A2の1種類のH_C認識抗体がBoNT/A2と反応した。これらの抗体はすべてH_Cを認識することから、ホルマリン処理によりH_Cの抗原性が部分的に消失することが示唆された。各ハイブリドーマから全RNAを調製し、RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction)により抗体の可変領域の塩基配列を調べた結果、重鎖可変領域(VH領域)において各クローンに特異的な配列があることから、BoNTへの結合に対してはVH領域が重要な役割を担うと考えられた。

第2章では、各mAbのBoNT/A1およびBoNT/A2に対する反応性をELISAで調べた。mAb-A1では、3種類がBoNT/A1にのみ反応した。mAb-A2では、3種類がBoNT/A2にのみ反応した。各mAb中和活性をマウス腹腔内投与法により調べた結果、BoNT/A1および/A2を構成する各ドメインを認識する抗体に中和活性を有することから、毒素中和に関わるエピトープが各ドメイン上に存在することがわかった。

第3章では、BoNTを構成する各ドメインと無毒成分との結合状態を調べるため、各ドメインを認識するmAbと複合体毒素(MおよびL毒素)との結合を免疫沈降法により調べた。複合体毒素の構造を保持させるため、すべての反応はpH 6.0の弱酸性条件下で行った。軽鎖認識mAbはすべての複合体毒素に反応したことから、軽鎖は複合体毒素分子の表面に露出していると考えられた。H_N認識mAbでは、一部のmAbが複合体毒素に反応しなかったことから、無毒成分がH_Nを部分的に覆い隠していることが示唆された。H_C認識mAbでは、一部のmAbはM毒素に反応したが、L毒素には反応しなかった。従って、M毒素の無毒成分(NTNH)は一部のH_C抗体の認識部位を、L毒素の無毒成分(NTNHとHA)はすべてのH_C抗体の認識部位を覆い隠していることが示唆された。

以上の結果は、抗原として使用するBoNTトキシイドがホルマリン処理によりH_Cの抗原性を部分的に消失していることを初めて明らかにした。また、BoNTを追加免疫することにより、BoNTのみの反応するmAbが得られることを実証した。各ドメイン認識mAbと複合体毒素との反応から、軽鎖部分は複合体毒素において分子表面に露出していること、重鎖部分が無毒成分との結合に関与し、HAはH_Cをさらに覆う状態でNTNHと結

合していると予想された。これら一連の成果は、ボツリヌス抗毒素の作製や複合体毒素の構造解析に関する新たな知見を示し、細菌毒素学および感染症制御学領域に大きく貢献すると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。