

|         |   |       |
|---------|---|-------|
| 称号及び氏名  | 博士（獣医学）   | 中村 佳司 |
| 学位授与の日付 | 平成24年3月31日  |       |
| 論文名     | <b>Characterization of the neurotoxin produced by the isolate from bovine botulism in Japan</b><br>(牛ボツリヌス症由来分離菌の産生する神経毒素の性状解析) |       |
| 論文審査委員  | 主査  | 小崎 俊司 |
|         | 副査  | 竹内 正吉 |
|         | 副査  | 山崎 伸二 |

## 論文要旨

### 緒言

ボツリヌス神経毒素 (**BoNT**)はグラム陽性偏性嫌気性桿菌であるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)から産生され、抗原性の違いにより **A-G** の7種類の血清型に分けられる。**BoNT** は軽鎖と重鎖から構成され、重鎖はさらに重鎖 **N** 末端 (**H<sub>N</sub>**)領域と重鎖 **C** 末端 (**H<sub>C</sub>**)領域に分けられる。軽鎖は細胞質内におけるプロテアーゼ活性、**H<sub>N</sub>** 領域は細胞内移行に関わるチャンネル形成を担う活性、**H<sub>C</sub>** 領域は受容体結合活性をそれぞれ持つことが知られている。**BoNT** は運動神経筋接合部シナプス終末において、シナプス前膜に存在する膜蛋白や糖脂質ガングリオシドと結合し、シナプス小胞リサイクリングによって細胞内に取り込まれる。小胞内の **pH** の低下によって膜にチャンネルを形成し、軽鎖が細胞質内に侵入する。**A, E** 型軽鎖は **SNAP-25** を、**B, D, F, G** 型軽鎖は **synaptobrevin/VAMP (VAMP1, VAMP2, VAMP3)** を、**C** 型軽鎖は **SNAP-25** および **syntaxin1A, syntaxin1B** をそれぞれ分解する。これらシナプス小胞の膜融合に関与する **SNARE (soluble NSF attachment protein receptor)** タンパク質が特異的に分解されることでアセチルコリンの放出阻害が起こる。その結果、ヒトや動物に致死的な弛緩性麻痺が引き起こされる。**A, B, E, F** 型菌はヒトのボツリヌス中毒の原因菌であり、家畜・

家禽のボツリヌス症は主として **C, D** 型菌により起こる。

近年多くのボツリヌス神経毒素遺伝子が解明され、**A, B, E** 型 **BoNT** において複数のサブタイプの存在が報告されている。**C, D** 型菌の中には、**H<sub>c</sub>** 領域の構造が他の型に入れ替わったモザイク毒素を産生する株が存在する。**D/C** モザイク毒素 (**BoNT/DC**)は軽鎖と **H<sub>N</sub>** 領域が **D** 型 **BoNT** (**BoNT/D**)と、**H<sub>c</sub>** 領域が **C** 型 **BoNT** (**BoNT/C**)とアミノ酸配列の相同性が高く、**C/D** モザイク毒素 (**BoNT/CD**)はその逆の構造を持つ。これまでにわが国において、鳥類ボツリヌス症由来菌が **BoNT/CD** 遺伝子を保有していることが報告されている。

牛ボツリヌス症は多大な経済的損失を引き起こす疾病であり、海外ではヨーロッパ、南北アメリカの各地で発生が報告されている。日本では、**1994** 年北海道における初めての事例の後、**2005** 年から **2011** 年まで全国的に集団発生が報告され、現在までに約 **600** 頭が死亡または廃棄処分されている。本症は肥育牛、乳牛に関わりなく発症し、原因毒素の性状や発症機序など多くの点が解明されていない。本研究では、わが国で発生したボツリヌス症罹患牛の検体からボツリヌス菌を分離し、分離菌が産生する **BoNT** について詳細に解析することを目的とした。

## 第 1 章 日本で発生した牛ボツリヌス症由来菌の毒素遺伝子の解析

牛ボツリヌス症由来分離菌 **19** 株の培養上清を用いたマウス中和試験では、**D** 型抗毒素血清で毒素は完全に中和された。さらに **C** 型抗毒素血清は致死時間が遅延することから部分的な中和が認められた。分離菌のうち **OFD05** 株の保有する神経毒素遺伝子塩基配列を解析し、**D/C** モザイク構造を有していることが分かった。典型的な **C** 型、**D** 型およびモザイク **BoNT** の遺伝子を比較し、共通部分と変異部分を組み合わせたプライマーセットにより、**C** 型、**D** 型およびモザイク毒素の各 **BoNT** 遺伝子の型別が可能な **PCR** 法を確立した。この **PCR** 法により各地で発生した本症罹患牛由来の分離菌が保有する神経毒素遺伝子を調べた結果、すべてが **D/C** モザイク構造を持つことが分かった。異なる年代・地域で分離された菌に対し、制限酵素 **SacII** または **NruI** を用いたパルスフィールドゲル電気泳動 (**PFGE**)解析を行うと共に、**BoNT** 遺伝子全長の塩基配列を決定した。**SacII**・**NruI** いずれの場合も **PFGE** に基づくデンドログラムにより分離菌は **3** つのクラスターに分類された。**BoNT/DC** のアミノ酸配列は同一の **PFGE** パターンを示した株間で完全に一致しており、異なるパターンを示す株の **BoNT/DC** 配列においても **H<sub>c</sub>** 領域のアミノ酸 **2** 残基の置換を除いて他の **BoNT/DC** の配列と一致した。これらのことから、わが国で発生している牛ボツリヌス症は **BoNT/DC** に起因すること、

さらに **BoNT/DC** のアミノ酸配列は各菌株間でよく保存されていることが明らかになった。

## 第 2 章 D/C モザイク毒素の毒性発現

**OFD05** 株培養上清から精製した **BoNT/DC** は既知の **BoNT** の中で最も高いマウス致死活性を持っていた。一方、**C** 型、**D** 型および 2 種のモザイク **BoNT** のラットに対する致死活性をマウスと比較すると、**BoNT/C**, **BoNT/CD**, **BoNT/D** はマウスとラット間で体重当たりの毒性に大差はなかった。しかし、**BoNT/DC** のラットに対する致死活性はマウスに比べて著しく低かった。**BoNT/D** 軽鎖の基質である **VAMP** のマウスおよびラット由来のホモログを **GST** 融合リコンビナント蛋白として調整し、**BoNT/DC** の基質切断活性を比較した。**BoNT/DC** 軽鎖はマウスとラットのリコンビナント **VAMP2** および **VAMP3** を同程度分解したが、ラット **VAMP1** に対する切断活性はマウスと比較して低かった。**BoNT/D** と **BoNT/DC** のマウスおよびラット初代小脳顆粒細胞に対する作用を **VAMP2** の切断とグルタミン酸の開口放出阻害を指標に調べた。マウス小脳顆粒細胞に対して、**BoNT/DC** と **BoNT/D** は同程度の **VAMP2** 切断活性とグルタミン酸放出阻害活性を示したが、ラット小脳顆粒細胞に対する **BoNT/DC** の **VAMP2** 切断活性とグルタミン酸放出阻害活性は **BoNT/D** より低かった。これらのことから、マウスおよびラット小脳顆粒細胞における各 **BoNT** に対する受容体も毒素感受性に関与していることが示唆された。TLC 免疫染色法により、**BoNT/C** がガングリオシド **GD1b** と **GT1b** に結合することが明らかにされている。同様の方法で **BoNT/DC** はガングリオシド **GM1a** に結合することが分かった。ガングリオシド **GM3** 合成酵素を欠損し **GM1a** などの発現を抑制したマウスに対する **BoNT/DC** の致死活性は野生型に比べて低下した。ラット褐色細胞腫由来 **PC12** 細胞に対し **BoNT/DC** は細胞質内の基質切断活性を示さないが、ガングリオシド **GM1a** を前処理すると、**BoNT/DC** による **VAMP2** 分解が確認された。これらの結果から **GM1a** が **BoNT/DC** の機能的受容体であることが示唆された。**BoNT/DC** が牛副腎髄質クロマフィン細胞のカテコールアミン分泌を抑制することが示されていることから、**BoNT/DC** がウシ神経系由来細胞に対して親和性があることが予想された。

## 第 3 章 D/C モザイク毒素の免疫学的特性

**BoNT/DC** の免疫学的特異性を確認するため、**BoNT/DC** に対するモノクローナル抗体 (**mAb**) を作製した。精製 **mAb** の **C** 型、**D** 型およびモザイク **BoNT** との反応性を **ELISA** およびイムノブロットニングで調べ、**BoNT/DC** に対する中和活性を確認した。

BoNT/DC の Hc 領域にのみ反応する 4 種の mAb が得られ、すべて BoNT/DC に対する中和活性を有していた。競合 ELISA により 3 種の mAb が異なる部位を認識していることから、BoNT/DC の Hc 領域には中和活性に関与する型特異的抗原決定基が少なくとも 3 ヲ所存在することが分かった。BoNT/DC は C 型、D 型抗毒素血清の両方と反応するため、ボツリヌス毒素の型別法として一般的なマウス中和試験による診断が困難である。このため BoNT/DC 特異的 mAb を用いた免疫学的検出法の確立を試みた。BoNT/DC と mAb のアフィニティーを表面プラズモン共鳴系によって算出し、BoNT/DC と親和性の高い 2 種類の mAb を選別した。これら 2 種の mAb を用いて BoNT/DC を特異的に検出するイムノクロマトキットを試作し、OFD05 株培養上清の検出感度を測定した。試作キットは 1,000 LD<sub>50</sub>/ml の毒素を検出することが可能であった。ボツリヌス症罹患牛の検体を増菌培養後の上清中の毒素は、一部を除き本キットによって検出が可能であった。

#### 総括

1. わが国で発生している牛ボツリヌス症は、BoNT/DC によることを初めて明らかにした。本症の分離菌が産生する BoNT/DC のアミノ酸配列は非常に類似していた。
2. BoNT/DC のマウス致死活性はすべての型の BoNT の中で最も高いが、ラットに対する致死活性はマウスに比べて著しく低かった。これは BoNT/DC の VAMP1 に対する酵素活性に起因すると考えられた。
3. げっ歯類由来小脳顆粒細胞に対する BoNT/DC の活性に差が認められたが、これには BoNT/DC に対する受容体に関係していると考えられた。ガングリオシド GM1a が機能的受容体の候補であることを示した。
4. BoNT/DC の Hc 領域には C 型、D 型 BoNT にはない D/C 特異的な抗原決定基が存在することを明らかにした。牛ボツリヌス症の診断を迅速に行うために、BoNT/DC と特異的に反応する mAb を利用したイムノクロマトによる検出法を確立した。

#### 審査結果の要旨

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) はグラム陽性偏性嫌気性桿菌であるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) から産生され、抗原性の違いにより A-G の 7 種類の血清型に分けられる。BoNT は軽鎖と重鎖から構成され、重鎖はさらに重鎖 N 末端 (H<sub>N</sub>) 領域と

重鎖 C 末端 (Hc)領域に分けられる。軽鎖は細胞質内におけるプロテアーゼ活性、H<sub>N</sub> 領域は細胞内移行に関わるチャネル形成を担う活性、H<sub>c</sub> 領域は受容体結合活性をそれぞれ持つことが知られている。多くのボツリヌス神経毒素遺伝子が解明され、C、D 型菌の中には、H<sub>c</sub> 領域の構造が他の型に入れ替わったモザイク毒素を産生する株が存在する。D/C モザイク毒素 (BoNT/DC)は軽鎖と H<sub>N</sub> 領域が D 型 BoNT (BoNT/D)と、H<sub>c</sub> 領域が C 型 BoNT (BoNT/C)とアミノ酸配列の相同性が高く、C/D モザイク毒素 (BoNT/CD)はその逆の構造を持つ。これまでにわが国において、鳥類ボツリヌス症由来菌が *boNT/CD* 遺伝子を保有していることが報告されている。牛ボツリヌス症は多大な経済的損失を引き起こす疾病であり、海外ではヨーロッパ、南北アメリカの各地で発生が報告されている。日本では、1994 年初めて症例が報告されたが、2005 年から 2011 年まで全国的に散発的な集団発生が起これ、現在までに約 600 頭が死亡または廃棄処分されている。本症は肥育牛、乳牛に関わりなく発症し、原因毒素の性状や発症機序など多くの点が解明されていない。本研究では、わが国で発生したボツリヌス症罹患牛の検体からボツリヌス菌を分離し、分離菌が産生する BoNT について詳細に解析することを目的とした。

第 1 章では、日本で発生した牛ボツリヌス症由来菌の培養上清を用いたマウス中和試験で、毒素は D 型抗毒素血清で完全に中和されるが、C 型抗毒素血清でも部分的な中和が確認された。分離菌 OFD05 株の保有する神経毒素遺伝子塩基配列を解析し、D/C モザイク構造を有していることが分かった。典型的な C 型、D 型およびモザイク BoNT の遺伝子を比較し、共通部分と変異部分を組み合わせたプライマーセットにより、C 型、D 型およびモザイク毒素の各 *boNT* 遺伝子の型別が可能な PCR 法を確立し、本症罹患牛由来の分離菌が保有する神経毒素遺伝子すべてが D/C モザイク構造を持つことが分かった。さらに BoNT/DC のアミノ酸配列は各菌株間でよく保存されていることを明らかにした。

第 2 章では、D/C モザイク毒素の毒素活性を調べるために OFD05 株培養上清から BoNT/DC を精製した。本毒素は既知の BoNT の中で最も高いマウス致死活性を持っていたが、ラットに対する致死活性はマウスに比べて著しく低かった。BoNT/DC 軽鎖はラット VAMP2 および VAMP3 を分解したが、VAMP1 に対する切断活性はマウスと比較して低かった。さらに BoNT/DC はガングリオシド GM1a に結合し、GM1a で前処理したラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞で BoNT/DC による VAMP2 分解が確認された。これらの結果から GM1a が BoNT/DC の機能的受容体であることが示唆された。

第 3 章では、D/C モザイク毒素の免疫学的特性を調べるためにモノクローナル抗体

(mAb)を作製した。その結果、BoNT/DC の Hc 領域にのみ反応する中和活性を持つ mAb が得られた。これら BoNT/DC 特異的 mAb を用いたイムノクロマトキットで  $10^3$  LD<sub>50</sub>/ml の毒素を検出することが可能であった。ボツリヌス症罹患牛の検体を増菌培養後の上清中の毒素は、一部を除き本キットによって検出が可能であった。

以上の結果は、現在わが国に発生している牛ボツリヌス症の原因毒素が BoNT/DC であることを初めて明らかにした。BoNT/DC のマウスに対する致死活性はすべての型の BoNT の中で最も高いが、ラットに対する致死活性はマウスに比べて著しく低かった。これは BoNT/DC の VAMP1 に対する酵素活性に起因すると考えられ、さらにガングリオシド GM1a が機能的受容体の候補であることを示した。BoNT/DC には特異的な抗原決定基が存在し、これらの部位を認識する mAb を利用したイムノクロマトによる検出法を確立した。これら一連の成果は、牛ボツリヌス症を解明するために必要な新たな知見を提供し、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。