

称号及び氏名	博士（獣医学）塚本 健太郎
学位授与の日付	平成18年3月31日
論文名	「Characterization of the binding substances for <i>Clostridium botulinum</i> type C and D neurotoxins」 (ボツリヌス菌C型およびD型神経毒素の結合物質の解析)
論文審査委員	主査 小崎 俊司 副査 山崎 伸二 副査 竹内 正吉

論文要旨

緒言

*Clostridium botulinum*の産生する神経毒素はヒトや動物に弛緩性麻痺を引き起こす極めて致死性の高い毒素である。神経毒素は血清学的にAからG型に分類され、型により罹患する動物種や感受性が異なる。A、B、E、F型はヒトのボツリヌス中毒を起こし、C、D型は家畜や鳥類のボツリヌス症の原因となっている。鳥類ボツリヌス症は家禽やカモ類等の水鳥を中心とした野鳥に突発的に発生し、時には多数の鳥が致死する事例が世界各地で報告されている。いずれの型の毒素も重鎖C末端領域 (H_c)、重鎖N末端領域、軽鎖の3つの領域から構成され、それぞれ毒作用発現に関わる受容体結合、細胞内侵入・移行、および細胞内標的蛋白の分解という異なる機能を担っている。毒素軽鎖は神経伝達物質の遊離に関与するSNARE蛋白群を型特異的に切断することで伝達物質の開口放出を阻害する。一方、 H_c が結合する毒素受容体についても毒作用の神経特異性や型特異性を決定づける上で重要な因子として考えられている。毒素受容体の候補として古くからガングリオシドが提唱されているが、毒素および H_c は生理的な条件下では結合せず、型特異性もないことからガングリオシド単独では受容体になり得ないと考えられてきた。実際、B型神経毒素については型特異結合蛋白質（シナプトタグミンII）と糖脂質（ガングリオシドGT1b）の複合体が特異的な受容体であることが証明されている。これに対して、動物・家禽のボツリヌス症事例から頻

繁に検出されるC型およびD型神経毒素の受容体については未だ不明である。本研究では、D型神経毒素が特異的に結合する細胞膜上の分子を同定し、その分子の機能的受容体の可能性について解析を行うことを目的とした。

第1章 ボツリヌス菌C型およびD型神経毒素受容体の同定

C型神経毒素には典型的なC型毒素を産生する株のほかに、H_CがD型に非常に類似した構造を有する毒素（C/Dモザイク型毒素）を産生する株の存在が知られている。最近、鳥類ボツリヌス症から分離されたC型菌がC/Dモザイク型毒素を産生することが報告された。CおよびD型神経毒素受容体を同定するため、C型毒素産生株（CB-19株、ミンクボツリヌス症由来）、C/Dモザイク型毒素産生株（003-9株、ニワトリボツリヌス症由来）およびD型毒素産生株（1873株、由来不明）から受容体結合領域H_Cのリコンビナント蛋白（H_C/CB-19、H_C/003-9およびH_C/1873）を作製し、それらのラット脳シナプトソームに対する結合活性を調べた。いずれのH_Cも神経毒素と同程度の結合活性を有しており、受容体を特定するためのリガンドとして適当であると考えられた。H_Cを¹²⁵I標識し、ラット脳シナプトソームに対する結合の型特異性を調べたところ、H_C/003-9とH_C/1873は非常に類似した受容体を認識するが、H_C/CB-19は異なる受容体に結合することが示唆された。それぞれの受容体の性状を調べるため、シナプトソームを可溶化し、種々の酵素および熱処理を加えた。H_C/CB-19に対する結合活性はエンドグリコセラミダーゼ（糖脂質の糖鎖とセラミドの結合を切断）およびノイラミニダーゼ（糖鎖中のシアル酸を遊離）処理により低下したが、プロテアーゼ処理や熱処理では影響を受けなかった。一方、H_C/003-9およびH_C/1873の結合はいずれの処理をしたシナプトソームに対して保持されていた。これらのことから3種のH_Cは非タンパク性の分子に結合し、特にH_C/CB-19はシアル酸を含有する糖脂質に結合する可能性が高いと考えられた。そこでラット脳シナプトソームから総脂質画分を抽出し、薄層クロマトグラフィー（TLC）で分離後、ビオチン標識H_Cを用いてoverlay assayを行った結果、移動度の小さい位置にH_C/CB-19と反応する二つの分子が、移動度の大きい位置にH_C/003-9とH_C/1873と反応する一つの分子が検出された。これらのH_Cに結合する物質を同定するため、種々の精製ガングリオシドおよびリン脂質に対する結合性を調べた結果、H_C/CB-19はガングリオシドGD1b、GT1bに、H_C/003-9とH_C/1873はリン脂質Phosphatidylethanolamine（PE）に生理的塩濃度の条件下で結合することがわかった。GD1bやGT1bなどのガングリオシドは脳、神経系に分布していることが知られているが、PEは細胞膜の主要な構成成分の一つであり、すべての細

胞に分布している。そこで脂肪酸の長さの異なるPEに対してH_C/003-9 の結合特異性を調べた結果、炭素鎖の長い脂肪酸を有するPEに対して特異的に結合することがわかった。以上の成績から、C型およびD型神経毒素受容体はいずれも非タンパク性物質で、C型毒素はガングリオシドGD1bおよびGT1bに結合し、D型毒素はPEが受容体として機能していることが示唆された。

第2章 C型およびD型神経毒素受容体におけるガングリオシドの依存性

細胞膜上の酸性スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドを受容体として認識する細菌毒素は数多い。最もよく知られているのはコレラ毒素でその受容体はGM1 である。破傷風毒素やボツリヌスA型および B型神経毒素についてもGD1aやGT1bなどのポリシアロガングリオシドが受容体成分として報告されているが、ガングリオシド単独では受容体として機能し得ないと考えられている。本章ではC型およびD型神経毒素受容体におけるガングリオシドの依存性について検討した。GD1bおよびGT1bを含む主要なガングリオシドを合成しないGM3合成酵素欠損マウス（明治薬科大学、齊藤教授より分与）の脳から総脂質画分を抽出し、TLC overlay assayでH_Cの結合性を調べた結果、H_C/003-9 とH_C/1873 は野生型と同様にPEに結合したが、H_C/CB-19 が結合する分子は欠損型マウス脳由来の脂質中に存在しなかった。このマウスから小脳初代培養顆粒細胞を調製し、各神経毒素で処理後、高カリウム刺激によるグルタミン酸の放出量を指標に毒素の効果を検討した。ガングリオシド欠損型の細胞に対してC/Dモザイク型毒素とD型毒素はグルタミン酸放出を阻害したが、C型毒素は作用しなかった。同時に毒素の細胞内基質の切断の程度をWestern blottingで調べると、欠損型の細胞ではC型毒素は基質であるシンタキシンを切断しなかった。さらに *In vivo*での致死活性をマウスに毒素を投与して評価したところ、C型毒素に対して欠損型マウスは抵抗性を示した。これらの成績からC型毒素は毒作用を発現するためにガングリオシドGD1bおよびGT1bの存在が不可欠であるが、D型神経毒素はガングリオシドの有無に関係なく毒性を発現することがわかった。

第3章 神経毒素の受容体認識に関与するアミノ酸残基の検索

破傷風毒素やボツリヌスAおよびB型神経毒素の結晶構造解析やH_Cの変異体を用いた結合実験からガングリオシドと毒素の結合に関与するアミノ酸残基が報告されている。しかしながら、C型およびD型神経毒素の結晶構造は明らかにされておらず、受容体認識に関わる

アミノ酸についても全くわかっていない。そこでC型およびD型神経毒素と受容体との結合様式を明らかにするため、C/Dモザイク型毒素分子内の 1112 番目から 1279 番目（C末端）のアミノ酸をC型に置換したキメラ変異体（H_C/DC1）、1223 番目から 1279 番目を置換した変異体（H_C/DC2）、1264 番目から 1279 番目を置換した変異体（H_C/DC3）を作製した。これらキメラ変異体の結合能をTLC overlay assayで調べると、H_C/DC1 はGD1bおよびGT1bに、H_C/DC3 はPEに結合した。H_C/DC2 はいずれの脂質分子にも結合しなかった。変異による構造変化の有無を調べるため、CDスペクトルを測定した結果、H_C/DC1 はH_C/CB-19 とH_C/DC2 はH_C/003-9 と類似の構造を保持していると考えられた。これらの成績からC型神経毒素のガングリオシド結合領域は 1122 番目からC末端側のアミノ酸残基中に、C/Dモザイク型およびD型神経毒素のPEへの結合領域は 1113 番目から 1263 番目の 151 残基中に存在すると考えられた。

総括

1. ボツリヌス菌 C 型神経毒素はガングリオシド GD1b および GT1b に、D 型神経毒素は Phosphatidylethanolamine に結合したことから、これらが受容体として機能することが示唆された。
2. C 型神経毒素は毒作用を発現するためには標的細胞膜上で GD1b および GT1b の存在が不可欠であり、他の型の神経毒素に比べて受容体構成成分としてのガングリオシドの役割が大きいと考えられた。一方、D 型神経毒素は標的細胞にガングリオシド非依存的に作用することから、受容体構成成分としてのガングリオシドの機能的な役割は極めて低いと考えられた。
3. C 型神経毒素分子内にも他の型の認められるガングリオシド結合モチーフが存在しており、このモチーフを含む領域が GD1b および GT1b への結合に関与することがわかった。D 型神経毒素の PE への結合領域は C 末端約 150 残基中に存在すると考えられた。

ボツリヌス神経毒素は元来食中毒に代表される毒素性疾患の原因物質であり、またバイオテロリズムに用いられる危害物質としての負の側面をもっている。一方、ジストニアなどの神経疾患の新たな治療薬としても実用化されている。しかしながら、分子レベルでの毒素の作用機構、特に毒素受容体に関しては未だ不明な部分が多い。本研究の成果は C 型および D 型神経毒素受容体の性状について新たな知見を提供した。今後、これらの成績は

ボツリヌス毒素の宿主特異性や多様性を解明する上で有用な手がかりになると考えられる。

審査結果の要旨

ボツリヌス菌の産生する神経毒素はヒトや動物に弛緩性麻痺を引き起こす極めて致死性の高い毒素である。神経毒素は血清学的にAからG型に分類され、A、B、E、F型はヒトのボツリヌス中毒を起こし、C、D型は家畜や鳥類のボツリヌス症の原因となっている。鳥類ボツリヌス症は家禽やカモ類等の水鳥を中心とした野鳥の発生事例が世界各地で報告されている。毒素は重鎖C末端領域 (H_c)、重鎖N末端領域、軽鎖の3つの領域から構成され、それぞれ作用発現に関わる受容体結合、細胞内侵入・移行、および細胞内標的蛋白の分解という異なる機能を担っている。 H_c が結合する毒素受容体については毒作用の神経特異性や型特異性を決定づける上で重要な因子として考えられている。本研究ではC、D型神経毒素が特異的に結合する細胞膜上の分子を同定し、その分子の機能的受容体の可能性について解析を行うことを目的としている。

第1章では、C型毒素産生株 (CB-19 株)、C/Dモザイク型毒素産生株 (003-9 株) およびD型毒素産生株 (1873 株) から受容体結合領域 H_c のリコンビナント蛋白 (H_c /CB-19、 H_c /003-9 および H_c /1873) を作製し、それらのラット脳シナプトソームに対する結合活性を調べた。いずれの H_c も神経毒素と同程度の結合活性を有しており、受容体を特定するためのリガンドとして適当であると考えられた。ラット脳シナプトソームに対する結合の型特異性を調べたところ、 H_c /003-9 と H_c /1873 は非常に類似した受容体を認識するが、 H_c /CB-19 は異なる受容体に結合することが示唆された。 H_c /CB-19 に対する結合活性はエンドグリコセラミダーゼおよびノイラミニダーゼ処理により低下したが、プロテアーゼ処理や熱処理では影響を受けなかった。一方、 H_c /003-9 および H_c /1873 の結合はいずれの処理をしたシナプトソームに対して認められた。ラット脳シナプトソームから総脂質画分を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離後、ビオチン標識 H_c を用いてoverlay assayを行った結果、 H_c /CB-19 はガングリオシドGD1b、GT1bに、 H_c /003-9 と H_c /1873 はリン脂質Phosphatidylethanolamine (PE) に生理的塩濃度の条件下で結合することがわかった。

第2章では、C型およびD型神経毒素受容体におけるガングリオシドの依存性について検討した。GD1bおよびGT1bを含む主要なガングリオシドを合成しないGM3 合成酵素欠損マウスの脳から総脂質画分を抽出し、TLC overlay assayで H_c の結合性を調べた結果、 H_c /003-9 と

H_C/1873 は野生型と同様にPEに結合したが、H_C/CB-19 が結合する分子は欠損型マウス脳由来の脂質中に存在しなかった。このマウスから調製した小脳初代培養顆粒細胞に対してC/Dモザイク型毒素とD型毒素はグルタミン酸放出を阻害したが、C型毒素は作用しなかった。さらに *In vivo*での致死活性をマウスに毒素を投与して評価したところ、C型毒素に対して欠損型マウスは抵抗性を示した。これらの成績からC型毒素は毒作用を発現するためにガングリオシドGD1bおよびGT1bの存在が不可欠であるが、D型神経毒素はガングリオシドの関与なしに毒性を発現することがわかった。

第3章では、C型およびD型神経毒素と受容体との結合様式を明らかにするため、C/Dモザイク型毒素分子内の 1112 番目から 1279 番目 (C末端) のアミノ酸をC型に置換したキメラ変異体 (H_C/DC1)、1223 番目から 1279 番目を置換した変異体 (H_C/DC2)、1264 番目から 1279 番目を置換した変異体 (H_C/DC3) を作製した。これらキメラ変異体の結合能をTLC overlay assayで調べると、H_C/DC1 はGD1bおよびGT1bに、H_C/DC3 はPEに結合した。H_C/DC2 はいずれの脂質分子にも結合しなかった。変異による構造変化の有無を調べるため、CDスペクトルを測定した結果、H_C/DC1 はH_C/CB-19 とH_C/DC2 はH_C/003-9 と類似の構造を保持していると考えられた。これらの成績からC型神経毒素のガングリオシド結合領域は 1122 番目からC末端側のアミノ酸残基中に、C/Dモザイク型およびD型神経毒素のPEへの結合領域は 1113 番目から 1263 番目の 151 残基中に存在すると考えられた。

以上の結果は、ボツリヌス C 型および D 型神経毒素の受容体の性状を明らかにし、作用機序の解析に重要な情報を提供している。また、これらの知見は未だ未解明である毒素の宿主特異性や多様性を解明する上で有用な手がかりになると考えられる。さらに本論文の成績はジストニアなどの神経疾患の治療薬として既に実用化されているボツリヌス毒素の新たな視点を開拓するものであり、獣医感染症学の分野ばかりでなく医学領域にも大きく貢献すると考えられる。したがって、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。