

氏 名	唐 津 修 羅		
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (生物産業学)		
学位記番号	甲 第 877 号		
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 17 日		
学位論文題目	ボツリヌス C 型菌 Yoichi 株が産生する毒素複合体の特異な翻訳後修飾とその経口毒性に関する研究		
論文審査委員	主査 教 授 ・ 博 士 (生物産業学)	相 根 義 昌	
	教 授 ・ 博 士 (獣医学)	丹 羽 光 一	
	教 授 ・ 博 士 (農芸化学)	中 澤 洋 三	
	名 誉 教 授 ・ 博 士 (農芸化学)	渡 部 俊 弘	

論文内容の要旨

ボツリヌス菌が産生するボツリヌス神経毒素 (BoNT) は、ヒトにおけるボツリヌス食中毒,あるいは,動物や家禽類に発症する家畜ボツリヌス症などの原因物質である。BoNTは,自然界においては単独で存在せず,非毒非血球凝集素 (NTNHA) および 3 種の血球凝集素 (HA-70, HA-17 および HA-33) などの無毒タンパク質が結合した毒素複合体 PTC として存在している。無毒タンパク質から遊離した BoNT を,経口的に動物に接種してもその経口毒性は低い。しかし, BoNT は, PTC を形成することで,高い経口毒性を示すようになる。ことから,無毒タンパク質は, PTC が経口毒素として機能するために,重要な役割を持つものと考えられている。

先の報告では, PTC 分子中の HA-33 は,特異的な糖鎖を認識することで腸管の上皮細胞に結合することが示されている。さらに, PTC は,その分子中の HA-33 の増加に伴い,小腸上皮細胞層を介した輸送が促進されることが明らかとなっている。すなわち, HA-33 は PTC が小腸から体内への侵入する際,重要な機能を果たすものと考えられている。

1961 年,北海道余市町および小樽市において,マッコウクジラの生肉が原因と考えられるミンクに対する家畜ボツリヌス症が発生した。その原因菌としてボツリヌス C 型菌 (C-Yoichi 株) が分離された。その後,本菌が産生する PTC の構造および機能解析が行われ,その特異性が明らかにされた。すなわち,他の C 型菌が産生する PTC は,細胞に結合する際,末端にシアル酸を有する糖鎖を認識している一方, C-Yoichi PTC は,末端にガラクトースを有する糖鎖を認識することが示された。また, C-Yoichi PTC の HA-33 は,培養中にその C 末端 31 残基が欠落することも示された。さらに, C-Yoichi PTC と他の C 型 PTC は, HA-33 を除く他の構成成分のアミノ酸配列の相同性が 99~100% であるのに対し, HA-33 の相同性のみが 74% と低い値を示していた。すなわち, C-Yoichi PTC は,他の C 型 PTC とは異なる構造を有しており,その機能性にも違いがあることが明らかとなっている。

しかし、C-Yoichi PTC の HA-33 に見られる C 末端アミノ酸残基の欠落のメカニズムや経口毒性に与える HA-33 の変異の影響については、不明である。著者は、C-Yoichi が産生する PTC の構造変化と機能性との関連性を明らかにするための研究を行った。本論文は、第 1 章においてボツリヌス菌および毒素タンパク質の研究についてその背景を述べたのち、第 2 章において、C-Yoichi PTC 由来 HA-33 のアミノ酸欠落試験に用いるための組換えタンパク質作成について述べた。第 3 章では前章で作成した組換えタンパク質を用いて、アミノ酸欠落の原因を解明する試験を行った。さらに、第 4 章では、C-Yoichi PTC とその他の C 型 PTC の代表として C 型菌 Stockholm 株 (C-St) 由来 PTC を用い、それらの細胞結合性の差異を、さらに第 5 章では、C-Yoichi PTC と C-St PTC のマウスに対する経口毒性を比較し、HA-33 の変異が PTC 全体の機能性に与える影響を検討した。さらに、本論文は、総括 (第 6 章) および結言 (第 7 章) としてまとめた。本要旨では、第 2 章から第 5 章について述べる。

第 2 章 組換え体 C-Yoichi HA-33 の作成

先の研究において、C-Yoichi が産生する PTC の構成成分のうち、HA-33 が菌の培養中に C 末端領域の 31 アミノ酸残基が欠落することが示されている。本実験では、まず C 末端の 31 残基のアミノ酸が欠落するようにオリジナルの *ha-33* 遺伝子に停止コドンを導入した組換えタンパク質の発現系を構築し、大腸菌での発現を試みた。しかし、発現したタンパク質は封入体を形成しており、実験に供することのできる形でのタンパク質を得ることができなかった。そこで、発現タンパク質の可溶性を高めるため、停止コドンを導入した *ha-33* 遺伝子上流に MBP タグを導入した組換え遺伝子を構築し、大腸菌で発現させた。その結果、可溶タンパク質として組換え体を得られた。しかし、TEV protease を用いて MBP タグを除去すると回収率が著しく低下し、実験に供することのできる量の回収には至らなかった。次に、HA-33 の可溶性を高めるためオリジナルの *ha-33* 遺伝子上流に HA タグと下流に FLAG タグを導入した組換え遺伝子 (C-Yoichi HA-33 dual-tag) を構築し大腸菌での発現を試みた。その結果、可溶タンパク質としての発現が認められた。さらに、HA-17 と HA-33 を共発現させるため、*ha-17* および *ha-33* 遺伝子を導入した組換え体の調製にも成功した。

第 3 章 組換え体 C-Yoichi HA-33 の切断試験

本章では、C-Yoichi HA-33 の欠落の原因を明らかにするため、前章で作成した C-Yoichi HA-33 dual-tag を用いた実験を行った。C-Yoichi の培養液と C-Yoichi HA-33 dual-tag を混合したところ、C-Yoichi HA-33 dual-tag の分子量の低下が見られ、native な C-Yoichi HA-33 と同様な分子量に変化していることが確認された。同様のことは、C-St の培養液と C-Yoichi HA-33 dual-tag との混合でも観察された。一方、混合液に EDTA を加えることで C-Yoichi HA-33 dual-tag の分子量の低下が阻害された。これらのことは、ボツリヌス C 型菌の培養液

中に含まれる金属プロテアーゼ様の酵素が C-Yoichi HA-33 の切断に関わっていることを示している。一方、C-St 由来 HA-33 を培養液と混合しても分子量の低下は見られなかったことから、C-Yoichi HA-33 にのみ、その分子内にプロテアーゼに対して感受性の高い領域があり、これによって C 末端領域の欠落が生じる可能性が示された。

第 4 章 C-Yoichi 由来 PTC の細胞結合性

C-St など、他の C 型 PTC は、HA-33 を介して、細胞表面のシアル酸を末端にもつ糖鎖に結合することが明らかにされている。一方、先の研究で、C-Yoichi PTC は、未処理の血球に対して凝集活性を示さないが、ノイラミニダーゼ (NDase) 処理を行った血球に対して凝集活性を示すことが明らかにされており、C-Yoichi PTC が、他の C 型 PTC とは異なる細胞結合性をもつことが示唆されている。本章では、特異な C-Yoichi PTC の細胞結合性および糖認識を調べる実験を行った。ラット小腸上皮細胞株 IEC-6 を用いて、C-Yoichi PTC の結合性を確認したところ、C-St PTC より結合性が低いことが確認された。一方、IEC-6 に NDase 処理を行なったところ、濃度依存的に C-Yoichi PTC の細胞結合性が増加した。NDase は、糖鎖末端のシアル酸を特異的に切断する酵素であり、NDase 処理することで糖鎖のガラクトースが末端として露出する。さらに、NDase 処理後の IEC-6 と Neu5Ac, Galactose, Lactulose, IPTG を用いて C-Yoichi PTC の細胞結合に対する糖阻害試験を行なった所、ガラクトースを含む糖で細胞への結合能が低下することが確認できた。このことから、C-Yoichi PTC は細胞表面のガラクトースを末端にもつ糖鎖を特異的に認識することが示唆された。

第 5 章 C-Yoichi 由来 PTC のマウス腹腔内および経口毒性

前章において、C-Yoichi PTC は他の C 型 PTC と細胞結合性が異なることが示唆された。本章では、C-Yoichi PTC の毒性を調べるために、C-St PTC とのマウスに対する毒性を比較した。まず、C-Yoichi PTC および C-St PTC のマウス腹腔内注射による毒性を比較した。その結果、腹腔内毒性は同程度であった。C-Yoichi および C-St 由来 BoNT のアミノ酸配列は、100% 一致しており、HA-33 のアミノ酸配列の違いは、消化管を介さない腹腔内投与において、影響を与えないことが示された。一方、C-Yoichi PTC および C-St PTC をマウスに経口的に投与し、それぞれの毒性を比較した。その結果、C-Yoichi PTC のマウス半数致死量は、0.025 μg であり、C-St PTC のそれは、2.287 μg であった。すなわち、C-Yoichi PTC は、C-St PTC に対して 90 倍の経口毒性を示した。前章の実験において、C-Yoichi PTC の細胞結合を阻害した Lactulose および IPTG を用いて、C-Yoichi PTC のマウス経口毒性糖阻害試験を行なったところ、マウス経口毒性が弱まることが確認された。以上の結果から、C-Yoichi における HA-33 の特異的な変異によりマウスに対する経口毒性が顕著に上昇していることが明らかとなった。

著者は、本研究によりボツリヌス中毒の原因物質であるボツリヌス毒素複合体の細胞認識の特異性と経口毒性に HA-33 が顕著な影響を与えることを明らかにした。ボツリヌス毒素複合体は、ヒトや家畜におけるボツリヌス症を引き起こすことから、その発症メカニズムの解明は、食品産業や畜産業における安全性確保や疾病発生の予防等において重要な知見である。さらに、ボツリヌス毒素の体内あるいは特異的な細胞への作用に関する今回の発見は、新規のドラッグデリバリーシステムや細胞診断技術の開発に応用できる重要な知見であると期待される。

審査報告概要

本研究は、日本初の家畜ボツリヌス症事例から分離されたボツリヌス C 型菌 Yoichi 株由来の特異な構造を有する毒素複合体の翻訳後修飾と経口毒性について明らかにしたものである。本菌が産生する毒素複合体は、5つの構成タンパク質のうち、HA-33 タンパク質にのみ複数のアミノ酸置換が生じた特異な毒素である。唐津氏は、この変異により部分的な立体構造の変化が生じ、菌の産生するプロテアーゼに対する感受性が上昇することで特異な分子内切断が生じていることを明らかにした。一方で、Yoichi 株由来毒素複合体は、小腸上皮株化細胞に対して他の株由来の毒素とは異なる糖鎖認識特異性を有することを見出し、その機能性にも HA-33 の変異が影響していることを明らかにした。さらに、HA-33 の変異がマウスに対する経口毒性を顕著に上昇させることを明らかにした。これらの知見は、これまで重要視されていなかった毒素複合体中の一分子（HA-33）が生体への侵入に係る重要な役割を果たしていることを明らかにした非常に重要な知見である。本論文の成果は、タンパク質の一次構造の変異が機能に変化をもたらすというタンパク質化学的に重要な知見であるとともに、毒素の体内への侵入機構の解明に貢献するものである。これらの研究成果等を総合的に評価した結果、審査員一同は博士(生物産業学)の学位を授与する価値があると判断した。