

ボツリヌス菌が産生する 毒素複合体に関する分子生物学的解析

渡 部 俊 弘^{*†}

(平成 31 年 3 月 13 日受付/平成 31 年 4 月 19 日受理)

要約：ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、グラム陽性偏性嫌気性の大桿菌であり、土壌中などでは芽胞として存在する。これらの芽胞は、ごくまれに食品に混入することがあり、さらに嫌気性などの条件が整うと食品中で芽胞が発芽、増殖し、毒素を産生する。本菌が産生するボツリヌス神経毒素 (neurotoxin ; BoNT) はボツリヌス中毒の原因であるタンパク質毒素である。ボツリヌス菌は BoNT の抗原性の相違から A から G 型の 7 つの型に分類される。自然界において、BoNT は単独で存在することがなく、他の無毒成分と結合し、毒素複合体 (toxin complex ; TC) を形成する。BoNT の作用機序は、ボツリヌス菌が増殖した食品に含まれる TC が経口摂取された後、胃を通過し、小腸上部から体内に吸収されることから始まる。本論文では、ボツリヌス中毒の歴史的背景、さらに著者らの研究成果を中心にボツリヌス TC に関する知見を述べ、最後に医療や美容分野におけるボツリヌス TC の利用に関する動向と著者らが考えるボツリヌス TC を応用した薬剤送達システムについて述べる。

キーワード：ボツリヌス菌、ボツリヌス神経毒素、ボツリヌス毒素複合体、立体構造

はじめに

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、*Clostridium* 属に分類されるグラム陽性偏性嫌気性の大桿菌であり、土壌中などでは芽胞として存在する。これらの芽胞が、ごくまれに食品に混入することがあり、さらに嫌気性などの条件が整うと食品中で芽胞が発芽、増殖し、毒素を産生する。これを誤って食べることにより“ボツリヌス食中毒”が生じる。

本論文では、ボツリヌス毒素に関する研究を述べるに先立ち、ボツリヌス食中毒の歴史を振り返る。18 世紀末のヨーロッパは、塩漬ハムやソーセージなど肉を原料とした保存食品が庶民の間に普及し始めた時代であった。その頃、ボツリヌス中毒 (Botulism : ラテン語でソーセージを意味する *botulus* に由来する) と呼ばれる致死率の高い食中毒が南ドイツを中心に多発し、その後、約 100 年の間、その原因も不明のまま、多くの犠牲者を出し続けた¹⁾。

1897 年、Ghent 大学の van Ermengem 教授は²⁾、ベルギーの Ellezelles で起こった食中毒の原因食の塩漬ハムから、嫌気性芽胞細菌を分離した。この細菌の培養濾液をマウス、モルモットに投与すると、これらの動物は、この中毒で死亡した患者と同様、特有の神経麻痺の症状を呈して斃死した。彼は、この細菌、厳密に言えば、細菌の産生した毒素がボツリヌス中毒の原因であると確信し、この細菌を *Bacillus botulinus* と命名した。これが、現在のボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) である。このように

原因が明らかとなり、保存食品の衛生管理に対する知識が広まり、ヨーロッパにおけるボツリヌス食中毒の発生は次第に減少した。

一方、アメリカでは 1920 年前後、豊富に生産された野菜や果物を保存するため、缶詰工業が飛躍的な発展を遂げ、自家製の缶詰も、手軽な保存食品として庶民の間に広まっていった。それがボツリヌス食中毒の多発を招いた。1918 年から 1922 年までの 5 年間で、米国では 83 件のボツリヌス食中毒が発生し、患者数は 297 名に達し、その中の 185 名が死亡している。すなわち、その致死率は 62% に達した。この事態を重く見た米国公衆衛生局は中毒対策委員会を設置し、缶詰業界は当時のサンフランシスコ大学の Meyer 教授に、食中毒防止についての研究を依頼した。数年後、研究の成果が実り、安全な缶詰製造のための対策が確立され、米国のボツリヌス食中毒の発生数は急速に減少した³⁾。

他方、日本では 1951 年、中村と飯田は、北海道岩内郡島野村で起こった食中毒 (14 名が罹患、4 名死亡) の原因究明に努力していた。翌年、彼らは、この食中毒の原因食となった“鯀の飯寿し”から、ボツリヌス E 型菌を分離した。これが日本におけるボツリヌス食中毒の最初の報告である⁴⁾。その後、約半世紀の間に、日本では 106 件のボツリヌス食中毒が発生し、患者数は 502 名、うち 115 名が死亡している。致死率は 23% である。

日本のボツリヌス食中毒の特徴のひとつは、発生地が北海道および東北 5 県に集中していること (93%)、2 つ目として、原因の 95% が“飯寿し”、“きりこみ”など、北国の

^{*} 東京農業大学名誉教授；北海道文教大学学長

[†] Corresponding author (E-mail : t-watanabe@do-bunkyo.ac.jp)

伝統的な郷土食品を摂取することによって起こっていること、3つ目として原因細菌がE型菌であることである。欧米のボツリヌス食中毒の原因細菌は、主としてA、B型菌によって起こるが、日本ではA、B型によるボツリヌス食中毒の発生は、全体のわずか8.4%に過ぎない。しかも、これらの食中毒の原因食は、いずれも海外からの輸入食品か、海外から輸入した原料を用いて製造された食品に限られていた。現在、ボツリヌス食中毒の多発していた北海道や東北地方では、安全な飯寿司の製造法が確立し、また各保健所にもボツリヌス抗毒血清が常備され、食中毒の発生数は激減し、ボツリヌス食中毒による死者の発生は報告されていない³⁾。

一方、ボツリヌス菌を原因とする食中毒は、ヒトだけではなく、家畜にも発生している。1970年代、東京および大阪で数千羽の水鳥が、北海道では飼育中のミンク数百頭が、また乳牛50頭(1994年)が斃死する事例が発生した。これらの動物の屍体、あるいは飼料から、ボツリヌスC型菌、あるいはその毒素が検出された。ボツリヌス食中毒の原因であるボツリヌス菌はそれぞれの菌が産生するボツリヌス神経毒素(neurotoxin; BoNT)の抗原性の相違からAからG型の7つの血清型に分類されるが、血清型により感受性動物が異なる。すなわち、A、B、EおよびF型はヒトに対して、また、CおよびD型はウシ、ウマなどの家畜や鳥類においてボツリヌス中毒を引き起こすことが知られている。

ボツリヌス毒素の本体 (神経毒素から毒素複合体へ)

1946年、Lamannaら⁵⁾は、ボツリヌスA型菌の培養濾液から分子量900kDaのタンパク質を結晶標品として得ることに成功した。このタンパク質は、ショ糖密度勾配遠心分析、電気泳動による解析によって、均一の物質であることが確認された。また、このタンパク質のマウスに対する毒性は 2.2×10^8 ip LD₅₀/mgNと著しく高かったため、当時このタンパク質がボツリヌス毒素の本体と考えられた。しかしその後、研究が進むにつれ、ボツリヌス菌の培養液から分子サイズの異なる毒素タンパク質が次々と分離され、毒素の本体をめぐる論争が続いた。そのような状況の中、1968年、DasGuptaら⁶⁾は、A型結晶毒素をpH 8.0の条件下でカラムクロマトグラフィーを行なうと、分子量150kDaの毒素活性をもつタンパク質と血球凝集活性をもつ無毒のタンパク質に分けることができると報告した。同様の方法により各型のボツリヌス菌の培養液からも、150kDaの毒素タンパク質が分離された。この150kDaタンパク質の毒素活性は、分子サイズの大きい毒素タンパク質のそれよりも高かったため、以後このタンパク質がボツリヌス毒素の本体とされ、ボツリヌス神経毒素(BoNT)と呼ばれるようになった。

1970年代、Sakaguchiら⁷⁾は、A~F型菌の培養液に存在する毒素タンパク質の分子サイズを詳細に調べた。彼らは、ボツリヌス菌の培養液には、900kDa(A)、500kDa(A、B、C、D、G)そして、300kDa(A、B、C、D、E、F)と分子サ

イズの異なる毒素タンパク質が存在するが、BoNTは単独では存在しないことを報告した。これらの高分子タンパク質は、150kDaのBoNT、130kDaの非毒非血球凝集素成分(nontoxic nonhemagglutinin; NTNHA)、そして70kDa、33kDaおよび17kDaの3種の血球凝集素成分(hemagglutinin; HA: HA-70, HA-33およびHA-17)から構成される複合体であり、サイズはそれを構成する3種のタンパク質の構成比に依存しているとした。

さらに、AおよびB型BoNT、そして複合タンパク質を、pH 1.4のラットの胃内容液と混合し、35℃に保ったとき、BoNTの毒素活性は速やかに消失したが、複合タンパク質のそれは、80分後もその毒性の60%以上を保持していることを示した。彼らはこの種の実験を重ね、次のように結論した。すなわち、ボツリヌス毒素が経口毒素であるとするならば、消化液中で速やかに失活するBoNTはボツリヌス毒素の本体とは言えず、複合タンパク質であるボツリヌス毒素複合体(TC; toxin complex)こそ真のボツリヌス毒素の本体である。

ボツリヌス神経毒素の作用機序

ボツリヌス菌が増殖した食品に含まれているTCは、経口摂取された後、胃を通過し、小腸上皮から吸収される。TC中のBoNTは、リンパ管内、あるいは血中で速やかに他の無毒成分と解離する。BoNTは単独で血流によって、標的細胞である末梢神経終末部に運ばれ、その細胞内へ侵入する。TCは動物の消化液の中では比較的安定で、TC分子内に存在するBoNTの毒素活性は保持されている。すなわち、消化液内でのBoNTの安定性は、無毒成分によって支えられている。このような経路でボツリヌス食中毒を引き起こしている(図1)。

1992年、Montecuccoら⁸⁾はすべての型のBoNT軽鎖の一次構造の中に“HEXXH”というアミノ酸配列のあることに気づいた。この配列は、thermolysinなど金属依存性プロテアーゼの分子内に存在するZn結合モチーフである。

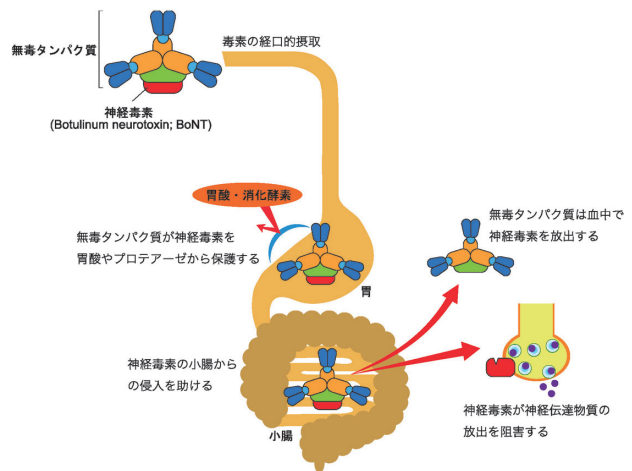


図1 ボツリヌス食中毒を引き起こす毒素の経路。食品などで芽胞が発芽し、増殖、毒素の産生が起これ、経口的に摂取された毒素は、胃・腸を経由して血流に入り、最終的に末梢神経の神経・筋接合部に到達する。

彼らは、精製した A, B および E 型 BoNT をキレート剤で処理し、Zn を除くと、それぞれの BoNT の毒素活性が消失することを示し、ボツリヌス BoNT 軽鎖が Zn 依存性プロテアーゼであると報告した。末梢神経の終末部に達した BoNT は、シナプス前膜に存在する特定の BoNT 受容体と結合する。この結合には BoNT 重鎖の C 末端領域が関与する。BoNT はエンドサイトーシスによって神経細胞内へ侵入する。BoNT は細胞内でエンドソームにとり込まれるが、その時点で重鎖と軽鎖は、それらを結ぶジスルフィド結合が還元され、軽鎖は重鎖と別れ、細胞質内に遊離する。エンドソームから軽鎖の遊離には、BoNT 重鎖の N 末端領域が関与している。

1992~94 年、Montecucco ら⁹⁾、そして Niemann らの研究グループは、プロテアーゼとしての軽鎖の基質を明らかにした。すなわち、B, D, F および G 型の BoNT 軽鎖は VAMP (synaptobrevin), A および E 型のそれらは SNAP-25、そして C 型の BoNT 軽鎖は SNAP-25 および syntaxin と呼ばれる膜タンパク質をそれぞれ基質として、それらのタンパク質分子内の特定のペプチド結合を切断することを確かめた。

BoNT が末梢神経終末に作用して、アセチルコリン (ACh) の放出を不可逆的に阻害し、神経と筋線維の興奮伝達を遮断する作用をもつことは 1950 年代から知られていた。しかし、その阻害機構の詳細は不明のまま残されていた。一方、Zn 依存性プロテアーゼとしての BoNT 軽鎖の標的となった 3 種の膜タンパク質は、いずれも神経終末の細胞内に局在し、シナプス小胞内の情報伝達物質をシナプス前膜から放出する機構、すなわち、シナプス小胞膜とシナプス前膜の膜融合を伴うエキソサイトーシスに必要なタンパク質と考えられていた。しかし、それらが実際にどのような役割を果たすかについての実験的証拠が欠けていた。したがって、Montecucco ら⁹⁾の研究は、BoNT の神経終末における作用機序を明らかにしただけではなく、神経伝達物質のエキソサイトーシスの機構の解明に大きく貢献したと言える。

神経細胞の興奮は軸索を通して神経終末に達する。化学物質を介して情報を伝達する神経終末では、軸索を伝わってきた活動電位がシナプス前膜を脱分極させ、それに伴ってシナプス前膜にある Ca チャンネルが開き、Ca イオンが細胞内に流入する。細胞内 Ca 濃度が上昇すると、シナプス小胞がシナプス前膜と膜融合し、情報伝達物質のエキソサイトーシスが始まる。BoNT 軽鎖の標的となった 3 種の膜タンパク質は、この情報伝達物質のエキソサイトーシスに際し、互いに相補的な役割を果たしていると考えられた。なぜなら、それらのうちの 1 つでも損傷を受けると、神経終末から神経-筋接合部への ACh の放出が停止することが明らかにされたからである。

毒素複合体構成成分の翻訳後修飾と複合体の形成

1990 年、Binz ら¹⁰⁾は A 型 BoNT の構造遺伝子のクローニングに成功し、その全塩基配列を決定した。これを契機

に、1992 年までに、A~G 型 BoNT のすべての構造遺伝子の全塩基配列が明らかにされた。次いで、A~G 型の TC を構成するタンパク質の構造遺伝子のクローニングが行なわれ、その全塩基配列が決定された。これらの遺伝子の塩基配列から推定された各型 TC 構成タンパク質のアミノ酸配列の相同性は、BoNT では 32~60%, NTNHA では 56~100%, HA-33 では 35~100%, HA-17 では、51~100%, HA-70 では、68~99.8% であった。

一方、BoNT に代表されるように、各構成タンパク質は翻訳後、その分子内にいくつかの nick (切れ目) が生じ、TC を構築している。遺伝子の発現により、BoNT は一本鎖のポリペプチドとして合成される。その後、分子内に nick が生じ、50 kDa の軽鎖と 100 kDa の重鎖に分かれる。しかし、両鎖はジスルフィド結合によって結ばれた二本鎖構造のタンパク質として存在し、TC に組み込まれている。Kitamura ら¹¹⁾は、分子内に nick が存在しない E 型 BoNT について研究し、BoNT 分子の nicking が、トリプシン様のプロテアーゼによって生じ、その存在が BoNT の毒性発現に重要な役割を果たしていることを示した。

各型の BoNT 分子内 nick site の特定が完結したのは 1999 年のことである。著者ら^{12,13)}は A~F 型 BoNT の nick site を明らかにし、分子内 nick site が 1 箇所である BoNT は B 型のみで、他の型ではいずれもジスルフィド結合の内側に、それぞれ 2 箇所の nick site が存在し、nicking によってそれぞれ数残基のアミノ酸が BoNT 分子から失われることを見出した (図 2)。

BoNT 以外の構成タンパク質においても分子内 nick の存在が確認されている。HA タンパク質の一つである HA-70 も菌体由来のプロテアーゼによって nick が生じ、N 末端側から 22~23 kDa 付近に複数の nick を受け^{12,14)}、22~23 kDa および 55 kDa のフラグメントに分かれる。BoNT および HA-70 分子内に生じる分子内 nick は、Arg あるいは Lys の C 末端側での切断によるものであった。このことから、BoNT および HA-70 分子内の切断は、ボツリヌス菌が産生するトリプシンと同様の基質特異性をもつプロテアーゼによるものであることが推測される。Suzuki ら¹⁵⁾は、C 型菌の培養液中に BoNT の分子内切断に関与するプロテアーゼ (Clostripain) の分離に成功している。

一方、Ohyama ら¹⁶⁾は、D 型 CBI6 株由来 M-TC の NTNHA の N 末端から 15 kDa 付近領域に、nick が生じており、L-TC のそれには認められないことを見出した。NTNHA 分子内の切断部位は、Thr/Ser 間に見出されたことから、他の構成成分とは異なるプロテアーゼによって生じるものと推測されたが、NTNHA の nick に関与する

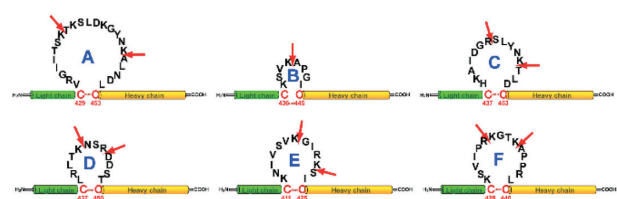


図 2 BoNT 分子内切断の位置

酵素は見出されていない。しかし、Sagane ら¹⁷⁾ は、その nick が NTNHA の保存中に自発的な自己触媒的に生じること、そして、プロテアーゼによっても加速することを明らかにした。さらに、Inui ら¹⁸⁾ は、NTNHA が BoNT と類似した立体構造を持ち、BoNT と同様に金属結合部位を有していることを示し、NTNHA 自身がプロテアーゼ活性を有する可能性を示した。

前述したように、BoNT を含めて殆どの血清型菌株由来の TC の構成成分は、菌体由来のプロテアーゼによる分子内 nicking などの翻訳後修飾を受ける。しかし、このことによって、SDS-PAGE 上で 7 本以上のバンドが観察され、TC タンパク質の構造解析は複雑となっていた。筆者らは、C および D 型の菌株の中に、その構成成分のいずれにも nick を認めない無傷の TC を大量に産生する特異的な D 型菌 4947 株 (D-4947) を見出し、Hasegawa ら¹⁹⁾ は、L-TC の精製と BoNT の分離法を確立した。さらに Miyata ら³¹⁾ は抗体沈降法により高度に精製された BoNT を全く含まない無毒成分タンパクの調製法を確立した。これにより、5 種の無傷の構成成分を取り扱うことが出来、毒素複合体の解析が格段に容易になった。さらに、無傷の D-4947 L-TC をトリプシン処理により、任意に nick 型の成熟毒素複合体を作成することができ、nicking による毒素複合体の構造変化、毒性発現・活性化の機構を考察することが可能となった。

Kouguchi ら²⁰⁾ は、D-4947 毒素複合体から各構成成分タンパク質の分離と再構成に初めて成功し、ボツリヌス毒素複合体の形成過程を明らかにした。最初に BoNT と NTNHA が結合した M-TC (分子量約 280 kDa) が形成する。この時、NTNHA に nick が生じていると、M-TC にとどまる。無傷の M-TC に HA-70 が結合し、さらに HA-17 を介して HA-33 が結合して L-TC (分子量約 650 kDa) が完成する。他の血清型の TC も同様な過程を経て完成すると考えられる。さらに、Mutoh ら²¹⁾ は、菌の培養液中のタンパク質を詳細に解析し、M-TC および L-TC とは分子サイズの異なる TC が存在することを明らかにした。これらの TC に HA-33/

HA-17 を滴定することで、L-TC へと変換したことから、新たに見出された TC は、M-TC から L-TC へと成熟化する過程における中間体であることが明らかとなった (図 3 右)。さらに、D-4947 株からの TC の大量精製、そして、L-TC 中間体の分離精製の成功は、次に述べる世界で初めてのボツリヌス TC の立体構造の解明につながる重要な成果であった。

毒素複合体の立体構造

ボツリヌス TC は、分子量が約 650 kDa の巨大なタンパク質複合体である。著者らは、先に述べたように D-4947 株の培養液から大量に TC を分離精製することに成功し、次に取り組んだのは、その立体構造の解明であった。X 線結晶構造を解析するため、L-TC 本体、そして、その構成成分の結晶化に挑戦した。L-TC から分離した HA-33/HA-17 複合体²²⁾ や組み換え大腸菌を利用した NTNHA の結晶化²³⁾ に、それぞれ成功し、X 線回折および立体構造の解析を行った。しかしながら、L-TC 本体を結晶化することは困難であった。そこで、著者らは、培養液中に存在する M-TC、L-TC そして、中間体をそれぞれ均一になるように精製し (図 3)、ネガティブ染色法を用いた透過電子顕微鏡 (TEM) によってそれぞれの立体構造を解析した²⁴⁾。その結果、図 4-5 に示すように、成熟した 650 kDa L-TC は、3 本の「アーム」状の構造を有する楕円形の構造を持つ形状であることが示された。この画像からだけでは、明らかにされた立体構造中の、どこにそれぞれの構成成分が位置するのかは不明である。そこで、さらに M-TC および中間体の TEM 画像と比較した (図 4-1~4)。その結果、「アーム」状の構造は、HA-33/HA-17 複合体であることが明らかとなった。また、中間体は、分子内の HA-33/HA-17 複合体の数が 2 本、1 本および 0 本と 1 本ずつ減少していることが示された。これらの知見から、HA-33/HA-17 複合体を含まない中間体を M-TC/HA-70、1 本含むものを 1-arm L-TC、2 本含むものを 2-arm L-TC、そして成熟化した L-TC を 3-arm L-TC と名付けた。これにより、著者らは、世界

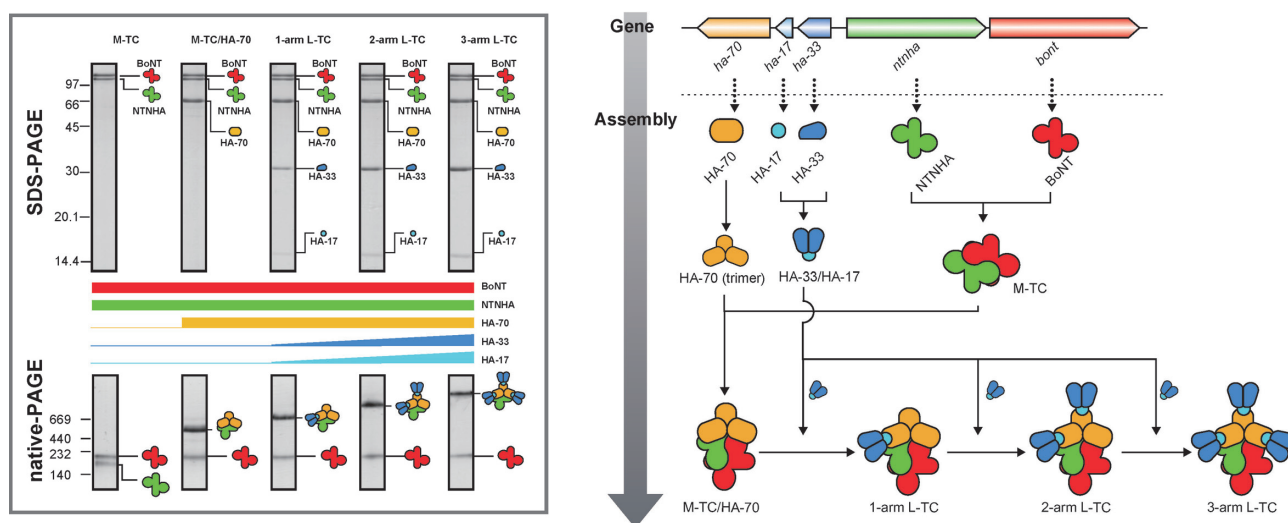


図 3 ボツリヌス TC の電気泳動バンドパターンと TC の形成機構モデル

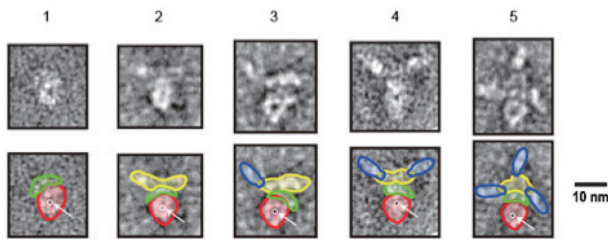


図4 ボツリヌス TC の TEM 画像. 1. M-TC, 2. M-TC/HA-70, 3. 1-arm L-TC, 4. 2-arm L-TC, 5. 3-arm L-TC. TEM イメージ中の BoNT, NTNHA, HA-70 および HA-33/HA-17 はそれぞれ赤, 緑, 黄, 青で囲った.

で初めて, ボツリヌス TC の立体構造を明らかにすることに成功した. その後, ボツリヌス A 型および B 型由来 L-TC の立体構造が TEM によって明らかにされ, D 型 L-TC と同様, 楕円状の本体から 3 本の「アーム」が伸びた形を有していることが示された.

3-arm L-TC の X 線結晶構造は, 現在でも成功していない. しかし, ボツリヌス TC のすべての構成成分の X 線結晶構造が解析されており, 各構成成分の X 線結晶構造と TEM 画像の組み合わせによって, ボツリヌス TC の構造が, 明らかにされた.

毒素複合体の動的立体構造

前述のように, ボツリヌス TC の立体構造は結晶構造解析やネガティブ染色法を用いた TEM によって明らかとなった. しかし, これらの解析手法は, タンパク質を固定して観察するため, 得られた立体構造はタンパク質の立体構造の側面ではない. また, タンパク質は, 様々な刺激によって, その形態を変化させる. Sagane ら²⁵⁾ は, X 線小角散乱法 (SAXS) によって, NTNHA 分子の溶液中での立体構造を解析した. 得られた解析像と X 線結晶構造との重ね合わせを行った結果, 分子内の一部 (C 末端側 1/3 の領域) において, 溶液構造と結晶構造に顕著な違いがあることが示された (図 5). このことは, NTNHA 分子の一部が, 溶液中においてフレキシブルな構造を持つことを示しており, 本構造が, BoNT との結合に関与しているものと考えられた.

また, Sagane ら²⁶⁾ によって, HA-33/HA-17 複合体についても SAXS を用いた解析が実施された. その結果, HA-33/HA-17 は, 溶液中において, 若干, 湾曲した構造を持つことが示された. さらに, 1 mM の *N*-アセチルノイラミン酸, グルコースおよびガラクトースの存在下における SAXS 像は, 非存在下におけるそれとは顕著な違いを示し, 糖の存在による HA-33/HA-17 の構造変化が示唆された (図 6). HA-33 は, 糖鎖を介した細胞への結合に関与していることが示されており, 糖との結合によるタンパク質構造の変化が細胞への結合に何らかの影響を与えている可能性がある. Suzuki ら²⁷⁾ は, ボツリヌス TC (M-TC, M-TC/HA-70, 1-arm L-TC, 2-arm L-TC および 3-arm L-TC) の SAXS 像から, 溶液中の各 TC の立体構造を明らかにしており, 複合体中の HA-33/HA-17 分子が, HA-70 だけで

NTNHA (Crystal) - NTNHA (Solution)

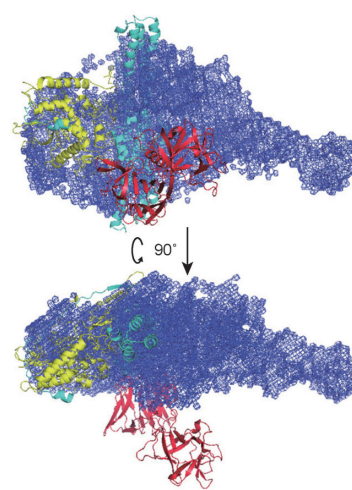


図5 NTNHA の SAXS 像 (青) と X 線結晶解析像 (黄・水色・赤) との重ね合わせ. X 線結晶解析像中の赤色の領域が, SAXS 像と重ならないことから, この領域がフレキシブルな構造を有するものと推測された.

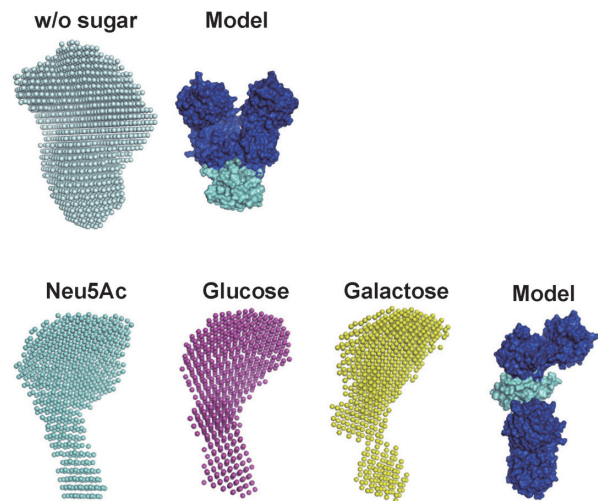


図6 HA-33/HA-17 複合体の SAXS 像とそれを基にした複合体のモデル図

なく, BoNT とも結合している可能性を示した (図 7).

さらに, Sagane ら²⁸⁾ は, 別の手法でボツリヌス TC の動的な立体構造について言及した. ボツリヌス TC のうち, 1-arm L-TC および 2-arm L-TC は, 37℃で長期保存している間に自発的に他の TC と HA-33/HA-17 を授受し, 複合体中の HA-33/HA-17 の数が異なる別の TC に移行することを示した. 同様の立体構造の移行は, 冷凍凍結操作中にも生じることも示した. これらの結果は, ボツリヌス TC は, 溶液中で絶えず立体構造の変化が起こっていることを示している. 今後, TC の動的な立体構造がボツリヌス TC の生体内への侵入機構などの生理的活性にどのような影響を及ぼすのか, その解明が期待される.

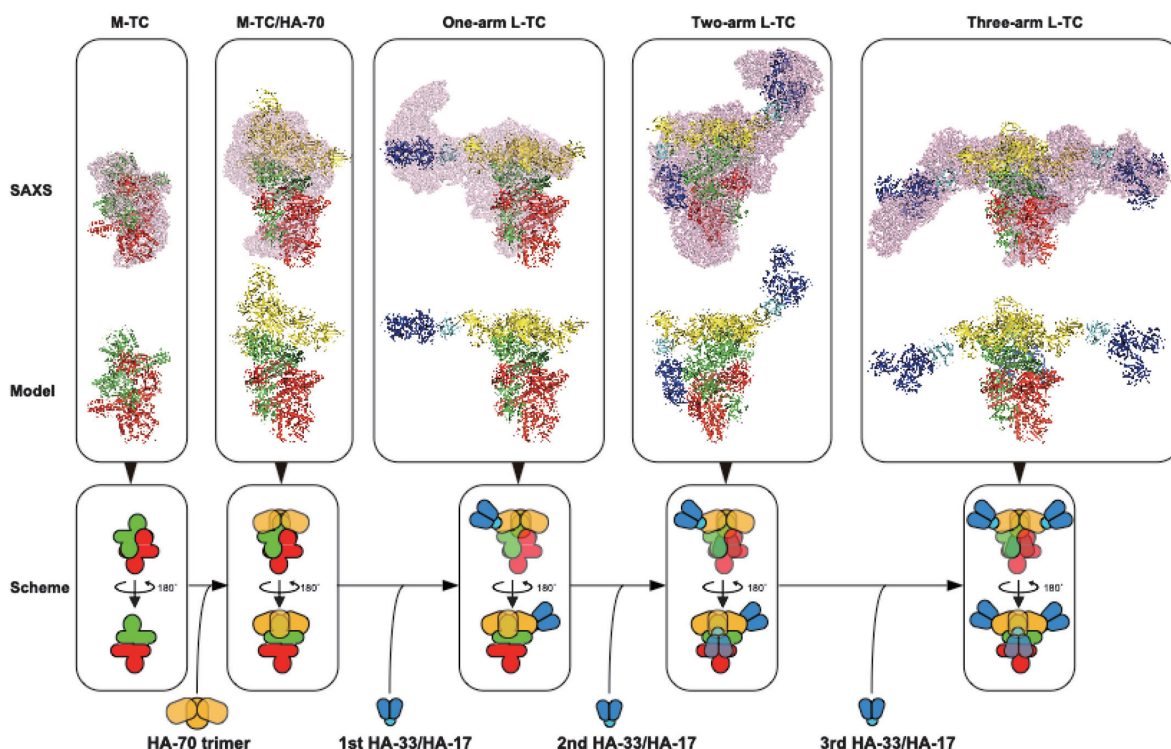


図 7 ボツリヌス TC (M-TC, M-TC/HA-70, 1-arm L-TC, 2-arm L-TC および 3-arm L-TC) の SAXS 像とそれを基にしたボツリヌス TC の立体構造モデル図

細胞生理学からみた毒素複合体

本論文において、ボツリヌス TC は、神経毒性を示す BoNT と「無毒」タンパク質が結合した複合体であると述べてきた。これは、TC 中の「無毒」タンパク質は、その存在が明らかにされたときから、「無毒」であると考えられてきたからである。しかし、近年、Miyashita ら²⁹⁾ によって TC の構成成分である「無毒」タンパク質複合体 (NTNHA/HA-70/HA-17/HA-33) をラットの小腸に投与すると、小腸絨毛の一部の細胞が剥がれ、粘膜の一部が破壊されることが見出された (図 8)。また、「無毒」タンパク質複合体は、ラット小腸上皮株化細胞 (IEC-6) に対して細胞毒性を示した。さらにピロリ菌が産生する空胞形成毒素 (VacA) が、十二指腸細胞に引き起こすのと同様の空胞の形成が観察された。これらの結果は、ボツリヌス TC 中の「無毒」タンパク質複合体が、小腸上皮組織に作用し、TC の生体内侵入に一役買っていることを示している。

一方、ボツリヌス TC 構成成分中の NTNHA タンパク質については、その生理的機能がほとんど明らかになっていないタンパク質である。Miyata ら³⁰⁾ は、BoNT と NTNHA が複合体を形成することでトリプシンやペプシンなどの消化酵素による分解を防いでいることを示しており、NTNHA は BoNT を保護する成分であると考えられる。しかし、その立体構造は、BoNT のそれと非常に類似しており、共通の先祖タンパク質から進化し、異なる機能を持ったものと考えられる。BoNT は、単独でも小腸上皮細胞へ侵入し透過する機能を有する。Miyashita ら^{31,32)} は、構造が似通った NTNHA にも共通の機能があるものと予測し、IEC-6 への

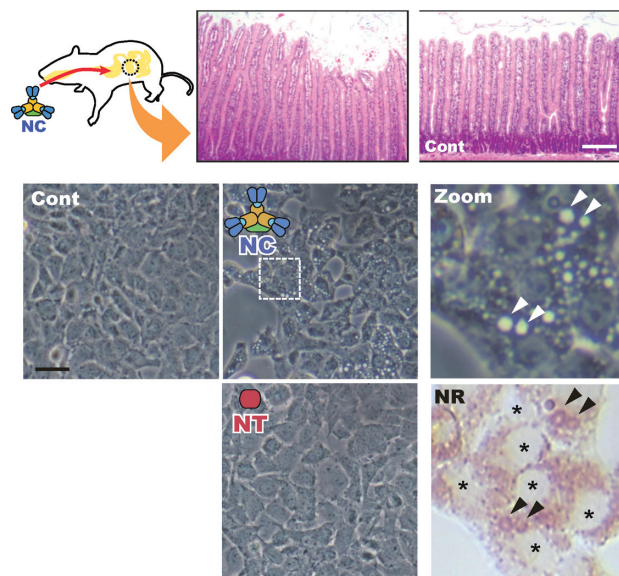


図 8 ボツリヌス「無毒」タンパク質複合体 (NC) の毒性。NC をラットの腸管に投与すると細胞の一部が剥がれ落ちた。また、培養細胞 (IEC-6) に作用させると細胞内に空胞が形成された。

侵入機能を調べた。その結果、NTNHA も単独で細胞内へ侵入する機能を有することが示された。今後、NTNHA の細胞内での生理的機能が明らかになることを期待している。

ボツリヌス毒素複合体の利用

ボツリヌス毒素の医療への応用の歴史は古く、1822 年に

ドイツ人医師の Justinus Kerner が運動過多疾患群や自律神経機能障害の治療に対するボツリヌス毒素の可能性を示唆したことが始まりと考えられている³³⁾。1980年代には、A型毒素の大量精製方法が確立し、アメリカの眼科医である Alan Scott によってボツリヌス毒素の斜視治療への応用が報告された。この頃より、ボツリヌス毒素の医療への応用が急速に発展することになる。Scott はボツリヌス A 型毒素製剤である“Oculinum[®]”の臨床治験を行い、1989年に Oculinum[®]は FDA から斜視や眼瞼痙攣、片側顔面麻痺の治療薬としての承認を得た。同年、アイルランドの医薬品企業である Allergan 社が Oculinum[®]の権利を取得し Botox[®]と名称変更した。1990年代から、Botox[®]による治療はアメリカ以外の国々でも承認され、現在その数は約 90ヶ国にのぼる。主な使用目的は斜視、眼瞼下垂、片側顔面痙攣の治療であるが、2009年に中国で眉間の皺の治療のための Botox[®]の使用が承認され、2014年には韓国で、2016年に日本で目尻の皺の治療のための使用が承認されるなど、近年になって美容目的での Botox[®]の使用承認が続いている。また、Botox[®]のほか Vistabel[®], Dysport[®], Reloxin[®], Xeomin[®], Neuronox[®], Puretox[®]など A 型毒素製剤が多く利用されているが、Myobloc[®]や Neurobloc[®]など B 型毒素製剤も開発されている。

このように、ボツリヌス毒素の神経麻痺作用を逆に取った応用が進む一方で、さらに応用範囲を広げようと別の観点からの研究が進んでいる。それが薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) への応用である。Goodnough ら³⁵⁾は、ボツリヌス神経毒素タンパク質が機能ドメイン構造を有していることに着目し、毒性本体である触媒ドメイン (軽鎖) を除いた細胞結合およびチャネル形成ドメイン (重鎖) を用いて、神経細胞を標的とした薬物送達担体として利用する研究について報告している。その一方、我々の研究グループは、ボツリヌス毒素の複合体構造に着目した DDS の開発を視野に入れた研究を実施している。すなわち、NTNHA や HA といった無毒なタンパク質群の胃酸・プロテアーゼへの耐性や小腸上皮細胞への接着能を利用し、機能性タンパク質やペプチドの運搬役とする考えである (図 9)。ランダムファージディスプレイ法を用いて、実際に NTNHA タンパク質に異種タンパク質を結合させる可能性を探る実験を実施し、塩基性および疎水性アミノ酸を多く含むペプチドが NTNHA に結合しやすいことを明らかにした³⁶⁾。また、BoNT 遺伝子にストップコドンが導入された変異株³⁷⁾や、BoNT 抗体を用いた免疫沈降法³⁸⁾など、BoNT を含まない「無毒タンパク質複合体」の調製法の開発にも取り組んでいる。

発見以来、致死性が高く、自然界で最も毒性の強い毒素として恐れられてきたボツリヌス毒素であるが、その構造と機能を調べると、非常に巧妙な仕組みによって体内へと侵入し、標的細胞へと到達する機能を有していることが明らかになってきた。これらの研究成果を、DDS の開発など、今後、何らかの形で活かしてもらえることを期待し、本総説を終える。

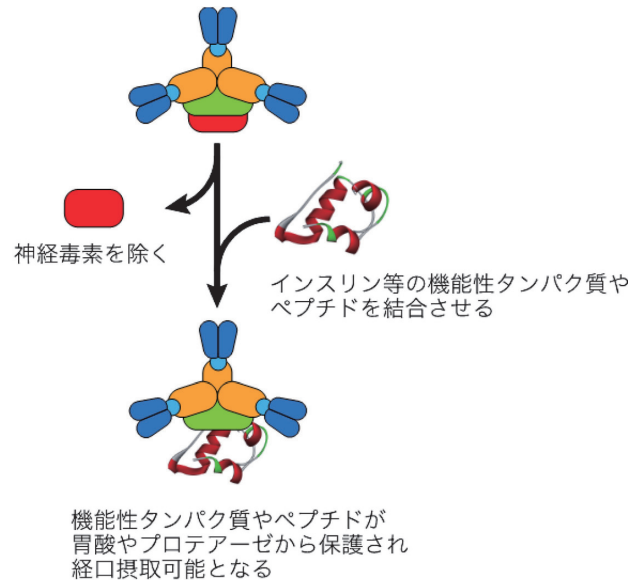


図 9 ボツリヌス TC を利用した薬物送達システムのアイデア。

謝辞: この研究の原点は、北海道オホーツクキャンパスでは地域に根ざした研究を行いなさいと私を導いて下さった故松田藤四郎先生、そして、自然界最強の毒であることから、この学部で実験を行うことは難しいと反対しながらも、私を信用して下さい、私を指導して下さいと下さった故井上勝弘先生のお二人のお陰です。二人の先生に親愛なる感謝の念を表します。

また、北海道立衛生研究所に在籍中からこの研究について実質的な指導をしていただき、さらに東京農業大学生物産業学部に移ってきて、長きに渡り、共同研究者として世界的な学術論文を作成をして下さいました大山徹先生に深甚なる感謝の意を表明します。そして、北海道大学より東京農業大学生物産業学部へ移り、細胞生理学的視点から共同研究者としてお力添えいただいた丹羽光一教授に深く感謝します。

さらに、学部3年からの卒業論文研究と博士前期後期過程において、研究に情熱を燃やし、貢献して下さった相根義昌博士、孝口裕一博士、武藤信吾博士、長谷川仁子博士、鈴木智典博士、米山徹博士、犬井健博士、林慎太郎博士、宮下慎一郎博士に敬意を表します。また、三上晃史君、近井智君、松尾智仁君、伊藤博章君をはじめとして、多くの修士課程修了者、そして学部卒業論文人としてさらに献身的に生物化学研究室を支えた院生、学生諸君・諸氏に感謝の気持ちを表します。

この研究は多くの共同研究者に協力を得ました。北海道立衛生研究所、砂川紘之博士、(株)第一三共の池田博士ら、(株)リガクの鈴木啓二氏、山野昭人博士、日本電子・及川さんに感謝いたします。

東京農業大学・桃木芳枝名誉教授、新村洋一教授、高野克己学長には常に我々を励まし続けていただきました。心より感謝申し上げます。

大澤貫寿学長 (現理事長)、横濱道成生物産業学部長 (現東京農業大学名誉教授) には、寛大なるご理解をいただき、

御支援して下さいました。この場を借りて、御礼申し上げます。

この研究は多くの方々に支えられながら続けてきました。お名前が挙がらなかった方々にも忘れず感謝しております。

この研究を始めたころの大変なとき、支えて、博士取得して、ノルウェー国ベルゲン大学の博士研究員から東京農業大学へ戻り、この研究を継続してくださっている相根義昌教授に感謝するとともに、さらにこの研究を推進していただきたいと思います。最後に、本稿を書くにあたり、ご協力いただいた相根義昌教授、鈴木智典准教授にお礼を申し上げます。

参考文献

- SIMPSON L (1989) Botulinum neurotoxin and tetanus toxin. 1st ed. Academic Press, UK.
- van ERMENGEM E (1987) Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. *Z. Hyg. Infekthr.* **65** : 1-56.
- 井上勝弘 (2001) 毒素・薬毒物と中毒 3 ボツリヌス毒素. *化学と生物* **39** : 612-616.
- 中村 豊, 飯田広夫, 佐伯 潔 (1952) 岩内郡島野村に起こったボツリヌス中毒について. *北海道立衛生研究所報特報*, 北海道
- LAMMANA C, EKLUND HW, McELROY OE (1946) Botulinum toxin (type A) ; including a study of shaking with chloroform as a step in the isolation procedure. *J. Bacteriol.* **52** : 1-13.
- DASGUPTA BR, BOROFF DA (1986) Separation of toxin and hemagglutinin from crystalline toxin of *Clostridium botulinum* type A by anion exchange chromatography and determination of their dimension by gel filtration. *J. Biol. Chem.* **243** : 1065-1072.
- SAKAGUCHI G, KOZAKI S, OHISHI I (1984) Structure and function of botulinum toxins. *Bacterial toxins*. Academic Press, UK. pp 435-444.
- SCHIAVO G, ROSSETTO O, SANTUCCI A, DASGUPTA BR, MONTECUCCO C (1992) Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J. Biol. Chem.* **267** : 23479-23485.
- MONTECUCCO C, SCHIAVO G (1994) Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* **13** : 1-8.
- BINZ T, KURAZONO H, WILLE M, FREVERT J, WERNARS K, NIEMANN H (1990) The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **265** : 9153-9158.
- KITAMURA M, SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI G (1968) Purification and some properties of *Clostridium botulinum* type E toxin. *Biochem. Biophys. Acta.* **168** : 207-217.
- WATANABE T, SAGANE Y, KOGUCHI H, SUNAGAWA H, INOUE K, FUJINAGA Y, OGUMA K, OHYAMA T (1999) Molecular composition of progenitor toxin produced by *Clostridium botulinum* type C strain 6813. *J. Protein Chem.* **18** : 753-760.
- SAGANE Y, WATANABE T, KOGUCHI H, SUNAGAWA H, INOUE K, FUJINAGA Y, OGUMA K, OHYAMA T (1999) Dichain structure of botulinum neurotoxin : identification of cleavage sites in type C, D, and F neurotoxin molecules. *J. Protein Chem.* **18** : 885-892.
- KOGUCHI H, SAGANE Y, WATANABE T, OHYAMA T (2000) Isolation of the components of progenitor toxin produced by *Clostridium botulinum* type C strain Stockholm. *J. Electroph.* **44** : 27-34.
- SUZUKI T, YONEYAMA T, MIYATA K, MIKAMI A, CHIKAI T, INUI K, KOGUCHI H, NIWA K, WATANABE T, MIYAZAKI S, OHYAMA T (2009) Molecular characterization of the protease from *Clostridium botulinum* serotype C responsible for nicking in botulinum neurotoxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379** : 309-313.
- OHYAMA T, WATANABE T, FUJINAGA Y, INOUE K, SUNAGAWA H, FUJII N, INOUE K, OGUMA K (1995) Characterization of nontoxic-nonhemagglutinin component of the two types of progenitor toxin (M and L) produced by *Clostridium botulinum* type D CB-16. *Microbiol. Immunol.* **39** : 457-465.
- SAGANE Y, WATANABE T, KOGUCHI H, SUNAGAWA H, OBATA S, OGUMA K, OHYAMA T (2002) Spontaneous nicking in the nontoxic-nonhemagglutinin component of the *Clostridium botulinum* toxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292** : 434-440.
- INUI K, SAGANE Y, MIYATA K, MIYASHITA S, SUZUKI T, SHIKAMORI Y, OHYAMA T, NIWA K, WATANABE T (2012) Toxic and nontoxic components of botulinum toxin complex are evolved from a common ancestral zinc protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419** : 500-504.
- HASEGAWA K, WATANABE T, SATO H, SAGANE Y, MUTOH S, SUZUKI T, YAMANO A, KOGUCHI H, TAKESHI K, KAMAGUCHI A, FUJINAGA Y, OGUMA K, OHYAMA T (2004) Characterization of toxin complex produced by a unique strain of *Clostridium botulinum* type D 4947. *Protein J.* **23** : 371-378.
- KOGUCHI H, WATANABE T, SAGANE Y, SUNAGAWA H, OHYAMA T (2002) *In vitro* reconstitution of the *Clostridium botulinum* type D progenitor toxin. *J. Biol. Chem.* **277** : 2650-2656.
- MUTOH S, KOGUCHI H, SAGANE Y, SUZUKI T, HASEGAWA K, WATANABE T, OHYAMA T (2003) Complete subunit structure of *Clostridium botulinum* type D toxin complex via intermediate assembly with nontoxic components. *Biochemistry* **37** : 10991-10997.
- HAYASHI S, AKIYAMA T, SAGANE Y, MIYASHITA S, WATANABE T, YAJIMA S, NIWA K (2014) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel haemagglutinin component of the toxin complex of serotype C *Clostridium botulinum*. *Acta Crystallogr. F* **70** : 370-373.
- MIYATA K, INUI K, MIYASHITA S, SAGANE Y, HASEGAWA K, MATSUMOTO T, YAMANO A, NIWA K, WATANABE T, OHYAMA T (2012) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Clostridium botulinum* type D nontoxic nonhaemagglutinin. *Acta Crystallogr. F* **68** : 227-230.
- HASEGAWA K, WATANABE T, SUZUKI T, YAMANO A, OIKAWA T, SATO Y, KOGUCHI H, YONEYAMA T, NIWA K, IKEDA T, OHYAMA T (2007) A novel subunit structure of *Clostridium botulinum* Serotype D toxin complex with three extended arms. *J. Biol. Chem.* **282** : 24777-24783.
- SAGANE Y, MIYASHITA S, MIYATA K, MATSUMOTO T, INUI K, HAYASHI S, SUZUKI T, HASEGAWA K, YAJIMA S, YAMANO A, NIWA K, WATANABE T (2012) Small-angle X-ray scattering reveals structural dynamics of the botulinum neurotoxin associating protein, nontoxic nonhemagglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425** : 256-260.
- SAGANE Y, HAYASHI S, AKIYAMA T, MATSUMOTO T, HASEGAWA K, YAMANO A, SUZUKI T, NIWA K, WATANABE T, YAJIMA S (2016) Conformational divergence in the HA-33/HA-17 trimer of serotype C and D botulinum toxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **476** : 280-285.
- SUZUKI T, SAGANE Y, MATSUMOTO T, HASEGAWA K, YAMANO

- A, NIWA K, WATANABE T (2017) Building-block architecture of botulinum toxin complex : conformational changes provide insights into the hemagglutination ability of the complex. *Biochem. Biophys. Rep.* **9** : 67-71.
- 28) SAGANE Y, MUTOH S, KOIZUMI R, SUZUKI T, MIYASHITA SI, MIYATA K, OHYAMA T, NIWA K, WATANABE T (2017) Reversible association of the hemagglutinin subcomplex, HA-33/HA-17 trimer, with the botulinum toxin complex. *Protein J.* **36** : 417-424.
- 29) MIYASHITA S, SAGANE Y, SUZUKI T, MATSUMOTO T, NIWA K, WATANABE T (2016) "Non-Toxic" proteins of the botulinum toxin complex exert *in-vivo* toxicity. *Sci. Rep.* **6** : 31043
- 30) MIYATA K, YONEYAMA T, SUZUKI T, KOGUCHI H, INUI K, NIWA K, WATANABE T, OHYAMA T (2009) Expression and stability of the nontoxic component of the botulinum toxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384** : 126-130
- 31) MIYASHITA S, SAGANE Y, NIWA K, WATANABE T (2013) Transport of the botulinum neurotoxin-associating protein, nontoxic nonhemagglutinin, across the rat small intestinal epithelial cell monolayer. *FEMS Microbiol Lett.* **346** : 73-80.
- 32) MIYASHITA S, NIWA K, WATANABE T, SAGANE Y (2014) Host-cell specificity and transcytosis of nontoxic nonhemagglutinin protein of botulinum neurotoxin serotype D. *FEMS Microbiol Lett.* **357** : 115-122.
- 33) ERBGUTH RJ, NAUMANN M (1999) Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) and the "sausage poison". *Neurology* **53** : 1850-1853.
- 34) SCOTT A B (1980) Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus.* **17** : 21-25.
- 35) GOODNOUGH MC, OYLER G, FISHMAN PS, JOHNSON E A, NEALE E A, KELLER J E, TEPP W H, CLARK M, HARTZ S, ADLER M. (2002) Development of a delivery vehicle for intracellular transport of botulinum neurotoxin antagonists. *FEBS Lett.* **513** : 163-168.
- 36) SAGANE Y, MIYATA K, KURIHARA S, YONEYAMA T, INUI K, MIYASHITA S, HAYASHI S, SUZUKI T, NIWA K, WATANABE T (2013) Random phage-display based screening of peptides that bind to botulinum neurotoxin binding protein, nontoxic nonhemagglutinin. *Curr. Microbiol.* **67** : 188-192.
- 37) SUZUKI T, NAGANO T, NIWA K, UCHINO M, TOMIZAWA M, SAGANE Y, WATANABE T (2017) Construction of "toxin complex" in a mutant serotype C strain of *Clostridium botulinum* harboring a defective neurotoxin gene. *Curr. Microbiol.* **74** : 49-54.
- 38) MIYATA K, SAGANE Y, INUI K, MIYASHITA S, SUZUKI T, OGUMA K, OHYAMA T, NIWA K, WATANABE T (2012) Purification and characterization of nontoxic protein complex from serotype D 4947 botulinum toxin complex. *Protein J.* **31** : 387-392.

Molecular Biological Studies on Botulinum Toxin Complex

By

Toshihiro WATANABE^{*†}

(Received March 13, 2019/Accepted April 19, 2019)

Summary : *Clostridium botulinum* is a gram-positive anaerobic bacterium that produces spores in unstable conditions. The spores occasionally enter food, and furthermore, they germinate under anaerobic conditions, and produce botulinum neurotoxin (BoNT). The BoNT is a protein toxin, which causes botulism. *C. botulinum* are classified into seven serotypes, A to G, based on the antigenicity of BoNT. In nature, BoNT does not exist alone, and it binds to the nontoxic proteins and forms a toxin complex (TC). The mechanism of action of BoNT begins with TC contained in the food in which the *Clostridium botulinum* is grown, orally ingested, then passes through the stomach and is absorbed into the body from the upper part of the small intestine. In this study, the historical background of investigation on botulism is reviewed, and findings on the botulinum TC focusing on the research results of the author's group are presented. Finally, the author describes the trends concerning the use of botulinum TC in the medical and beauty fields and the application of botulinum TC in the drug delivery system.

Key words : *Clostridium botulinum*, botulinum neurotoxin, botulinum toxin complex, three-dimensional structure

^{*} Professor Emeritus, Tokyo University of Agriculture ; President, Hokkaido Bunkyo University

[†] Corresponding author (E-mail : t-watanabe@do-bunkyo.ac.jp)