

博士（獣医学） 砂川紘之

学位論文題名

ポツリヌスC型菌とD型菌の毒素変換ファージに関する研究

学位論文内容の要旨

ポツリヌスC型菌とD型菌がわが国で土壤などから頻繁に分離されるようになったのは比較的最近であって、東京や千葉などで野鳥のポツリヌス中毒が発生した1973年以降のことである。ポツリヌスC型菌とD型菌は少なくとも2種類のファージを保有しているが、それらのうちの大型のファージが親株の毒素産生性を支配していることが明らかにされて以来、ポツリヌスファージの研究は主に毒素産生性との関係に焦点をあてて進められてきた。しかしそれらの研究に用いられた菌株はいずれも諸外国で分離されたもので、わが国で分離された菌株についてはほとんど研究がなされていない。本研究ではわが国で分離されたポツリヌスC型菌とD型菌についてファージの検索を行うとともに、分離ファージの形態、宿主特異性ならびに抗原性について、これまでに諸外国で分離されたC型菌とD型菌由来のファージとの比較検討を試みた。またC型菌とD型菌各1株のそれぞれが保有する毒素変換ファージと毒素非変換ファージの生物学的・生物物理学的性状ならびにそれらのファージから分離されたDNAの物理化学的性状を明らかにし、さらにD型ファージDNAから神経毒素遺伝子をクローニングしてその塩基配列を決定した。その結果は以下のとおりである。

1. わが国で発生した水鳥、ミンクとブロイラーのポツリヌス中毒例から分離されたポツリヌス菌と中毒の発生に関連した地域の土壤から分離された菌株、合計C型菌8株とD型菌1株について溶原ファージの分離を試みた。その結果D型菌1株から従来報告されているファージとは宿主特異性や抗原性の上で異なる新型の毒素変換ファージが分離された。またD型菌1株とC型菌2株からC型菌とD型菌の両方に共通に感染していると考えられる毒素非変換ファージが分離された。すなわちポツリヌスC型とD型の毒素変換ファージは宿主特異性と抗原性が多様なファージ群であり、それらの性質の違いによって少なくとも4群に分かれることが明らかになった。

2. ポツリヌスC型菌C-468株とD-DCB16株から分離された毒素変換ファージCE β とd-16 ϕ ならびに毒素非変換ファージCE γ とd-1'について各種のウイルス学的性状を調べた。ファージCE β 、d-16 ϕ 、CE γ とd-1'は、それぞれ吸着定数 $1.1 \times 10^{-8} ml/min$ 、 $3.3 \times$

$10^{-8} ml/min$, $1.4 \times 10^{-8} ml/min$ と $1.4 \times 10^{-8} ml/min$ で感受性菌に吸着された。一段階増殖での潜伏期はそれぞれ35分, 45分, 35分と35分で平均放出数は38個, 85個, 35個と35個であった。温度 pH, 紫外線ならびに有機溶媒などに対するファージの感受性を調べたところ毒素変換ファージはこれらの因子に対して毒素非変換ファージより強い感受性を示したが、前者の CE β と d-16 ϕ , また後者の CE γ と d-1' はそれぞれ同じ感受性を示した。

3. 精製した CE β , d-16 ϕ , CE γ と d-1' の各ファージ粒子から DNA を抽出し、それらについて種々の物理化学的性状を調べた。CE β , d-16 ϕ , CE γ と d-1' の DNA の浮遊密度はそれぞれ $1.687 g/cm^3$, $1.689 g/cm^3$, $1.687 g/cm^3$ と $1.688 g/cm^3$, また融解温度 Tm は $80.0^\circ C$, $80.0^\circ C$, $81.3^\circ C$ と $81.1^\circ C$ であった。HPLC による塩基分析の結果、GC% は、CE β では 25.9%, d-16 ϕ では 26.0%, CE γ では 28.4%, また d-1' では 27.7% であった。7 種類の制限酵素による切断パターンを比較した結果、2 種類の毒素変換ファージ DNA では切断パターンに差異が認められたが、毒素非変換ファージ DNA ではいずれの酵素を用いても切断パターンは全く同一であった。制限酵素による切断片の大きさから測定した DNA の塩基対数は毒素変換ファージでは約 110 kbp, また毒素変換ファージでは約 65 kbp であった。各毒素変換ファージの DNA の間のホモロジーは 50~75%, また毒素変換ファージの DNA 間のホモロジーはほぼ 100% であったが毒素変換ファージと毒素非変換ファージの DNA 間でホモロジーは認められなかった。これらのファージ DNA の性状試験においても毒素変換ファージは分離ファージ毎に性状に違いが認められたが、毒素非変換ファージではいずれの試験においても差異は認められなかった。

4. D 型菌 D-CB16 株の産生する D 型神経毒素を精製して還元剤の存在下で重鎖と軽鎖に解離させ、それらの標品を作製した。さらに軽鎖と重鎖を 2 種類の蛋白分解酵素を用いて限定的加水分解を行い、それぞれ 2 個と 3 個のポリペプチドを得た。そこでこれらの軽鎖と重鎖についてアミノ酸分析計を用いてアミノ酸組成を分析するとともに、これらの蛋白ならびにポリペプチドの N 末端アミノ酸配列をダイレクトマイクロシーケンシング法により決定した。D 型神経毒素で決定されたアミノ酸配列を A 型と C 型神経毒素のそれと比較すると、共通な薬理作用による毒性発現機能を分担しているとされている軽鎖は N 末端部分に各型に共通なアミノ酸配列を持っていた。しかし感受性動物細胞への毒素の吸着と軽鎖を細胞内へ取り込ませる作用を分担しているとされている重鎖では N 末端のアミノ酸配列が各型毒素ごとに異なっていた。これらのこととは各型毒素が共通の薬理作用を持ちながら型ごとに動物種によって毒力が異なるというボツリヌス神経毒素の特徴を端的に説明するものと思われる。

5. ファージ d-16 ϕ DNA から λ gt11-*E. coli* Y1090株のクローニング系を用いてD型神経毒素遺伝子をクローニングした。イムノスクリーニング法およびエピトープ抗体選択法によってクローンの選択と同定を行ったところ、得られたクローン D-3 の挿入 DNA はD型神経毒素のN末端に対応する21mer のオリゴヌクレオチドプローブと高い相同性を示し、D-3 挿入 DNA の制限酵素地図上の H 2 断片の位置にD型神経毒素のN末端が存在することが判明した。制限酵素で切断したD-3 挿入 DNA 断片を PUC 系とM13系ベクターを用いてサブクローニングして、毒素遺伝子の塩基配列を決定した。その結果ボツリヌスD型菌 D-CB16株の產生するD型神経毒素に対応する3,825bp の ORF を含む塩基配列が決定された。この配列から推定された1,275残基のアミノ酸配列（分子量146,785）はダイレクトマイクロシーケンス法によって得られた毒素構成蛋白とそれらの部分ポリペプチドのN末端アミノ酸配列と一致し、推定された配列が正しいことが裏付けられた。D型神経毒素は軽鎖（441アミノ酸残基、分子量50,410）と重鎖（834残基、分子量96,394）によって構成され、軽鎖のC末端近傍と重鎖のN末端近傍にはジスルフィド結合を形成して両鎖を連結していると推定されるシステイン残基の存在が認められた。D型神経毒素の塩基配列ならびにアミノ酸配列をすでに報告されているボツリヌスA型と C_I型神経毒素および破傷風神経毒素のそれと比較すると、D型神経毒素は C_I型神経毒素とかなり高い相同性を示し、また軽鎖よりも重鎖でより高い相同性が認められた。D型神経毒素と A 型神経毒素の相同性の程度はD型神経毒素と破傷風神経毒素との場合とほぼ等しかった。

本研究はボツリヌス C 型と D 型毒素変換ファージ研究の基礎資料を提供し、さらにD型神経毒素の塩基配列の決定によりボツリヌス神経毒素の遺伝子レベルでの研究を可能とした。この成果を基礎としてボツリヌス神経毒素の抗原決定基あるいは機能ドメインの分子構造に関する研究がより一層進展し、有効で安全なワクチンの開発がなされるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　橋　本　信　夫
副　查　教　授　波　岡　茂　郎
副　查　教　授　清　水　悠紀臣
副　查　助教授　首　藤　文　榮

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は極めて強い神経毒素を產生し、ヒトや動物の重篤な食中毒として知られるボツリヌス症を引き起こす。これまで本菌は毒素の抗原性をもとに A ～ G の 7 菌型に分類されている。C 型菌と D 型菌の神経毒素產生性は両型菌の保有する毒素変換ファージによって支配され、しかもそれぞれの毒素は型あるいは株特異的な抗原決定基のみならず両型毒素に共通な抗原決定基を有し、血清学的に多様な毒素群を構成している。しかしこれらのファージの性状に関してはボツリヌス C 型と D 型の神経毒素の構造遺伝子が毒素変換ファージの DNA に組み込まれているにもかかわらず、これまでほとんど知られていない。著者はまず C 型と D 型のファージのウイルス学的性状と DNA の物理化学的性状を明らかにするとともに D 型神経毒素の全塩基配列を決定し、その全アミノ酸配列を推定した。本論文はこれらの成績をまとめたもので、邦文 127 頁からなり参考論文 7 編を付している。

1. わが国で分離されたボツリヌス C 型菌 8 株と D 型菌 1 株について溶原ファージの分離を試みた結果、D 型菌 1 株から従来報告されているファージとは宿主特異性や抗原性の上で異なる新型の毒素変換ファージが分離された。また D 型菌 1 株と C 型菌 2 株から両型菌に共通に感染していると考えられる毒素非変換ファージが分離された。つぎに、C 型菌 C - 468 株と D 型菌 D - CB 16 株から分離された毒素変換ファージ CE β と d - 16 ϕ ならびに毒素非変換ファージ CE γ と d - 1' について宿主菌への吸着定数、一段階増殖パターン、潜伏期間、平均放出数ならびに温度、pH、紫外線や有機溶媒などに対するファージの感受性を明らかにした。毒素変換ファージはこれらの因子に対して毒素非変換ファージよりも強い感受性を示した。さらにこれらのファージから抽出された DNA の浮遊密度と融解温度を測定して GC% を算出するとともに、高速液体クロマトグラフィーによって構成塩基の分析を行った。その結果、GC% は、CE β と d - 16 ϕ で 26%，また CE γ と d - 1' では 29% であった。7 種類の制限酵素による DNA の切断パターンの比較では、毒素変換ファージ CE β と d - 16 ϕ の DNA の間では差異が認められたが、毒素非変換ファージ CE γ と d - 1' の DNA の間ではいずれの酵素を用いても切断パターンに差

異は認められなかった。制限酵素による切断片の大きさから算出されたDNAの塩基対数は毒素変換ファージでは約110kbp、また毒素非変換ファージでは約65kbpであった。各毒素変換ファージのDNA間のホモロジーは50～75%、また毒素非変換ファージのDNA間のホモロジーはほぼ100%であったが毒素変換ファージと毒素非変換ファージのDNA間でホモロジーは認められなかった。このように毒素変換ファージのDNAではいずれの試験においても分離ファージごとに性状に違いが認められたが、毒素非変換ファージでは差異は認められなかった。

2. D型菌D-CB16株の產生するD型神経毒素を精製し、その軽鎖と重鎖についてアミノ酸分析計を用いてアミノ酸組成を分析するとともに、それらの毒素構成蛋白とこれらを限定的加水分解して得られた5個のポリペプチドについてダイレクトマイクロシーケンス法によりN末端アミノ酸配列を決定した。さらにD型ファージd-16 ϕ DNAから λ gt11-E. coli Y1090株のクローニング系を用いてD型神経毒素遺伝子をクローニングした。次いでクローンDNAの制限酵素地図を作成し、D型神経毒素に対応する3,825bpのORFを含む塩基配列を決定した。この配列から推定された1,275残基のアミノ酸配列（分子量146,785）はダイレクトマイクロシーケンス法によって得られた毒素構成蛋白とそれらの部分ポリペプチドのN末端アミノ酸配列と一致し、推定された配列の正しいことが裏付けられた。D型神経毒素は軽鎖（441アミノ酸残基、分子量50,410）と重鎖（834アミノ酸残基、分子量96,394）によって構成され、さらに軽鎖のC末端近傍と重鎖のN末端近傍にはジスルフィド結合を形成して両鎖を連結していると推定されるシステイン残基の存在が確認された。

以上のごとく、本研究によってボツリヌスC型菌とD型菌の毒素変換ファージおよび毒素非変換ファージのウイルス学的性状ならびにファージDNAの物理化学的性状が明らかにされた。さらにD型神経毒素の全塩基配列を決定できたことから、ボツリヌスC型とD型神経毒素の遺伝子レベルでの研究が可能となった。これらの知見はボツリヌス神経毒素の抗原決定基あるいは機能ドメインの分子構造に関する研究を進める上で貢献するところが大きい。よって審査員一同は砂川紘之君が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認める。