特別シンポジウム わが国のボツリヌス研究の温故知新～阪口先生のご研究に焦点を当てて～

● History of the Basic and Applied Research in Botulism in Japan: Featuring Research Achievement by Dr. Sakaguchi

阪口玄二先生とボツリヌス毒素研究

Accomplishments on Botulinum Toxin Study by Prof. Genji Sakaguchi

小崎 俊司[†]

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻)

Shunji KOZAKI

(Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences,
Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-Orai-kita, Izumisano, Osaka 598-8531)

はじめに

ボツリヌス毒素は、ボツリヌス菌の産生する神経毒で、ボツリヌス中毒（症）の原因物質である。菌は毒素の抗原性によりA～G型の7型に分類されている。ボツリヌス中毒は、通常、食品中で産生された毒素の経口摂取で起こる。毒素は腸管壁から吸収され、神経・筋接合部に運ばれ、神経末梢からの神経伝達物質の遊離を抑制することで弛緩性麻痺を引き起こすので致死活性は著しく高い。

阪口玄二先生は、わが国で食中毒事例が多く発生していたE型中毒の原因となつたはずしからボツリヌス菌と、クロストリジウム属菌を分離し、これらを混合培養すると毒素の毒力が増強する活性化現象を発見した。この研究を端緒としてA型からG型毒素の精製方法を確立し、これらの構造と機能に関する幅広い研究を進め、世界的なボツリヌス毒素研究の先導的役割を果たしてこられた。本稿では、先生の代表的な業績について簡潔に紹介する。

複合体毒素(progenitor toxin)の構造と機能

A型毒素は、1946年結晶化が報告され、1950年代後半からB型からG型毒素も精製が行われたが、毒素活性や分子量について食い違いが見られた。先生は、食品や培地に産生される毒素(progenitor toxin)をE型菌から精製に成功し、得られた毒素は毒性成分（神経毒素、分子量15万）と同じ分子量を持つ無毒成分から構成されていることを明らかにした⁵⁾。その後、他の型の毒素を相次いで精製し、全型の複合体毒素の活性と分子構造の比較解析を進めた。その結果、すべての毒素は、神経毒素と無毒成分から構成され、A型菌はLL, L, Mの3種類、B, C, D型菌はL, Mの2種類、E, F型菌はMの1種類、G型菌はLの1種類の毒素を産生することを明らか

にした⁷⁾。神経毒素は同じ分子量であることから、毒素の分子サイズの違いは、結合している無毒成分の大きさで決定され、LLとL毒素の無毒成分のみ血球凝集活性を有している（図1）。さらに、各型複合体毒素と神経毒素のマウスに経口投与し測定した毒力を調べた結果、腹腔への投与では分子量が小さいほど毒力が高いのに対して、経口毒力は分子量が大きいほど高い^{6,8)}（表1）。これは、分子サイズが大きい毒素ほど酸性条件下や消化酵素に対して安定であることから、無毒成分はボツリヌス毒素が経口毒として作用する際、必須の成分であることを示している。

毒素の活性化現象と分子構造

わが国で最初のボツリヌス中毒が北海道で発生し、E型毒素によることが明らかにされた。当時の所見では、E型毒素の毒性は低いが、致死率はA型、B型と比べて遜色はなく、E型毒素はヒトに対する毒性が他の型の毒素と比べて高いと想像されていた。しかし、先生らは、原因食品であるはずしから分離したE型菌と、同時に分離したある種のクロストリジウム属菌とを混合すると、毒素の活性が数百倍に上昇することを見出した^{9,10)}。この現象はクロストリジウム属菌の産生する蛋白分解酵素によると推察された。この報告後、トリブシンにより毒素が活性化することが報告された¹⁾。

E型毒素は活性化されても、毒力以外、分子量や抗原性に変化が起こらない。弱アルカリ化条件で、活性化された神経毒素と無毒成分に解離し、活性前の毒素の構造と変化がないことを証明した。活性化前の神経毒素を還元処理すると1本鎖であるのに対して、活性化された神経毒素は分子内に解裂(nicking)が起こり、1本鎖から2本鎖構造に変化する（図2）。この分子内解裂は他の細菌毒素でも見られるが、ボツリヌス毒素は顕著な毒力の上昇を伴う。A, B, F型菌が自ら産生する蛋白分解酵素は、トリブシンと類似した基質特異性を持ち、E型毒素を活性化する。この知見は、蛋白質分解性A, B, F菌の産生する毒素は、既に活性化された状態で食品内などに

[†]連絡先 kozaki@vet.osakafu-u.ac.jp

〒598-8531 大阪府泉佐野市りんくう往来北1-58

図1. Progenitor toxinの性状

図2. E型毒素の活性化に伴う分子構造の変化

表1. ボツリヌス毒素のマウス腹腔内毒力と経口毒力の比較

毒素		Mouse oral LD ₅₀ in equivalent number of ip LD ₅₀ × 10 ³
型	サイズ	
A	LL	120
	L	2,200
	M	3,600
	S	43,600
B	L	1.5
	M	1,100
	S	24,000
C	L	2.7-6.7
	M	95-270
D	L	35-76
	M	96-880
E	M	220
	S	750
F	M	1,100
	S	6,000

S: 神経毒素

表2. 種々の酵素によるB型およびE型神経毒素の活性化

酵素	毒力 (×10 ⁶ LD ₅₀ /mg)	
	B型	E型
未処理	0.4	0.1
トリプシン	103.0	23.2
リシルエンドペプチダーゼ	198.0	20.5
エンドプロテイナーゼ・Lys-C	198.0	20.7
エンドプロテイナーゼ・Arg-C	0.4	0.1

存在することを示している。

トリプシンは、リジンとアルギニンのC末端を特異的に切断するが、片方のみを切断する特異酵素を用いて調べると、活性化現象が顕著なB型、E型神経毒素はリシルボンドと特異的に切断する酵素で活性化されることを明らかにした(表2)。さらに、活性化と平行してリシルボンドが切断され、2本鎖構造に変化することから、活性化は毒素分子内のリシルボンドの加水分解であることを

実証した³⁾。

活性化された神経毒素は重鎖（分子量10万）と軽鎖（分子量5万）のフラグメントから構成される。毒性成分を還元すると毒性を消失する。また、各フラグメント単独では、毒素活性を示さない。しかし、両フラグメントを混合し、再酸化して神経毒素を再構成させると毒素活性を回復する⁴⁾。このことは、ボツリヌス毒素の活性発現の最小単位が分子量15万の神経毒素であり、二つのフラグメントが相補的に機能することにより毒性を発現していることを示した。

おわりに

細菌毒素の研究は、菌が産生する「自然の形」で精製することが必要である。先生は、この基本的な考え方を重視し、ボツリヌス毒素が細菌毒素では希な構造を持つ、活性の本体である神経毒素とこれに結合する分子サイズの異なる無毒成分との複合体であることを、すべての型の毒素を精製することにより実証した。食品内毒素型食中毒の代表としてのボツリヌス中毒は、無毒成分が神経毒素に結合していることにより成立する。無毒成分は神経毒素の活性保護ばかりでなく腸管からの吸収に積極的な役割を果たしていることが、同シンポジウムの藤永由佳子博士らにより解明されている²⁾。ボツリヌス毒素は、細菌毒素の中で毒素活性においても多彩である。E型毒素の活性化現象の発見は、菌が産生する未活性の毒素が摂取されると、体内で活性化されることを容易に想像させる。細菌毒素の分子内解裂は他の毒素でも認められるが、これに伴う毒素活性の上昇はボツリヌス毒素に特徴である。さらに、神経毒素を構成するフラグメントの機能解析は、その後の分子レベルにおける毒性発現機構などボツリヌス毒素に関する研究課題の容量を大きくした。その他、乳児ボツリヌス症由来菌毒素の性状解析から、毒素型には亜型があることを証明するなど、現在のボツリヌス毒素研究の根幹となる多大な足跡を残している。

文 献

- 1) Duff, J. T., Wright, G. G., Yarinsky, A.: Activation of *Clostridium botulinum* type E toxin by trypsin. J. Bacteriol., **72**, 455-460 (1956).
- 2) Fujinaga, Y., Sugawara, Y., Matsumura, T.: Uptake of botulinum neurotoxin in the intestine. Curr. Top. Microbiol. Immunol., **364**, 45-59 (2013).
- 3) Kozaki, S., Oga, Y., Kamata, Y., Sakaguchi, G.: Activation of *Clostridium botulinum* type B and E derivative toxin with lysine-specific proteases. FEMS Microbiol. Lett., **27**, 149-154 (1985).
- 4) Kozaki, S., Ogasawara, J., Shimote, Y., Kamata, Y., Sakaguchi, G.: Antigenic structure of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin and its interaction with gangliosides, cerebroside, and free fatty acids. Infect. Immun., **55**, 3051-3056 (1987).
- 5) Lamanna, C., Sakaguchi, G.: Botulinal toxin and the problem of nomenclature of simple toxins. Bacteriol. Rev., **32**, 242-249 (1971).
- 6) Ohishi, I., Sugii, S., Sakaguchi, G.: Oral toxicities of *Clostridium botulinum* toxins in response to molecular size. Infect. Immun., **16**, 107-109 (1977).
- 7) Sakaguchi, G.: *Clostridium botulinum* toxins. Pharmacol. Ther., **19**, 165-194 (1983).
- 8) Sakaguchi, G., Sakaguchi, S.: Oral toxicities of *Clostridium botulinum* type E toxins of different forms. Jpn. J. Med. Sci. Biol., **27**, 241-244 (1974).
- 9) Sakaguchi, G., Toyama, Y.: Studies on the toxin production of *Clostridium botulinum* type E. I. A strain of genus *Clostridium* having the action to promote type E botulinal toxin production in a mixed culture. Jpn. J. Med. Sci. Biol., **8**, 247-253 (1955).
- 10) Sakaguchi, G., Toyama, Y.: Studies on the toxin production of *Clostridium botulinum* type E. II. The mode of action of the contaminant organisms to promote toxin production of type E organisms. Jpn. J. Med. Sci. Biol., **8**, 255-262 (1955).