

## ボツリヌス毒素研究の急進展

北海道立食品加工研究センター 池田隆幸

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) は嫌気性菌 *Clostridium botulinum* が産生するタンパク質毒素で、破傷風神経毒素とならんで、天然、人工のあらゆる毒素の中でもっとも毒性が強く、人間に対する推定致死量はわずか 50 ng (ラットでの LD<sub>50</sub> は 0.1 ng/kg 以下) と言われている。抗原性により A 型～G 型の 7 種類の型に分けられ、ヒトはこれまで BoNT/A, B, E, F 型によって中毒が引き起こされてきた。BoNT は、一本鎖の部分活性型の毒素として菌から放出され、分子内ジスルフィド結合によって生じたループ部分を自分自身のプロテアーゼあるいはトリプシンによって 50 kDa の軽鎖と 100 kDa の重鎖に切断され数百倍に活性化される。このうち軽鎖が活性 (毒性) ドメインとして働いているとされていた。BoNT による中毒症状は、嘔吐に始まって手足の麻痺から呼吸困難を経て窒息死するが、このような作用は BoNT が神経筋接合部やコリン作動性のシナプスに結合し、最終的にアセチルコリンの放出を阻止することで引き起こされる。しかし、BoNT がどのようにしてアセチルコリンの放出を阻害するかの詳細は不明であった。

最近になって、軽鎖の持つ活性の解明が進み、毒性発揮機構が明らかになってきた。すなわち、数年の間に BoNT/A, B, C1, D, E, F 型神経毒素遺伝子がクローニングされ、その遺伝子構造が明らかとなり、アミノ酸配列を推定できるようになった。その結果、すべての型の BoNT の軽鎖の中に亜鉛エンドペプチダーゼの Zn<sup>2+</sup> 結合モチーフ (HExxH) 配列が含まれていることが明らかとなった。そこで、人間に中毒を引き起こす BoNT/A, B, E の精製毒素と Zn<sup>2+</sup> の吸着を調べたところ、Zn 1 原子が BoNT に 1:1 で結合し、その結合は EDTA によって可逆的に遊離させることができた。さらに、diethyl pyrocarbonate でヒスチジンを修飾すると Zn<sup>2+</sup> の結合が阻害されるが、Zn<sup>2+</sup> が結合しているときには二つのヒスチジンが修飾を受けないことが示され、BoNT は亜鉛エンドペプチダーゼであると考えられた。<sup>1)</sup>

そこで、問題となるのがターゲットタンパク質は何かと言うことであるが、ごく最近一気に解明された。BoNT/A, E は SNAP-25 (synaptosome associated protein of 25 k) を、<sup>2,3)</sup> BoNT/B, D, F が VAMP/synaptobrevin を特異的に切断することが明らかとなった。<sup>4,5)</sup> SNAP-25 はシナプス細胞膜部分に多い膜関連タンパク質であり、VAMP/synaptobrevin はシナプス小胞タンパク質である。これら二つのタンパク質は、シナプス小胞の融合に関与する NSF (N-ethylmaleimide sensitive fusion protein) と SNAPs (soluble NSF attachment proteins) とが複合体を形成するために必要な SNAP レセプターの構成成分として最近同定された。<sup>6)</sup> シナプス小胞と前シナプス細胞膜とが結合複合体を形成することが神経伝達物質のエキソサイトーシスで放出に必要であると考えられているが、この二つの独立した実験結果から、BoNT がその構成成分の一つを切断するためアセチルコリンの放出が起きないと考察された。前シナプス細胞の軸索末端における Ca<sup>2+</sup> の流入からエキソサイトーシスによるアセチルコリンの放出機構はこれまで未知の領域であったが、今後その解明が期待される。

さて、BoNT 遺伝子構造が明らかになったことによって、PCR を用いて BoNT 遺伝子を検出することが可能となり食品衛生検査への応用も期待されている。PCR による増幅と digoxigenin ラベルしたプローブを用いることで 10 fg の DNA (三細胞のボツリヌス菌に相当) を検出することが可能で、しかもプライマーによって毒素型を見分けることもできた。<sup>7)</sup> この検出感度は実用レベルに達しており、あとはいかに食品に応用するかということまでできている。これまでわが国のボツリヌス中毒は主として北海道や東北地方に発生し、その大半が E 型菌によるものであった。しかし、アメリカや中国では A 型、フランスでは B 型が圧倒的に多く、地域による汚染度が異なる。今後、さらに輸入食品の増加や流通食品の拡大により、広範囲なボツリヌス中毒発生の危険を常に考慮しなければならないことから、従来のマウスの接種法に代わる BoNT 検出法の確立が急務であり、PCR 法に期待がかかっている。

分子生物学の進歩により、BoNT に関する研究が飛躍的に進展し、史上最強の毒のペールが剥がされその内部にメスが入ろうとしている。毒をよく知ることによって、最良の薬を作ることや毒を無害化することも可能である。

- 1) Schiavo, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 23479 (1992).
- 2) Schiavo, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 23784 (1993).
- 3) Blasi, J. et al.: *Nature*, **365**, 160 (1993).
- 4) Schiavo, G. et al.: *Nature*, **359**, 832 (1992).
- 5) Schiavo, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 11516 (1993).
- 6) Sollner, T. et al.: *Nature*, **362**, 318 (1993).
- 7) Szabo, E. A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3011 (1993).