

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

「バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究」
分担研究報告書

「ボツリヌス菌・毒素の検査法の改良」

研究分担者 見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部

要旨:ボツリヌス毒素 (BoNT) を迅速簡便に検出するために、SNAP25 と synaptobrevin を連結した組換えタンパク質を作製した。これを使用した検出法では、全ての血清型の BoNT の検出が可能であり、精製 BoNT の場合 A 型、E 型で数マウス LD₅₀/ml、E 型、F 型で数十マウス LD₅₀/ml 程度の量を 3 時間以内に検出することができた。この方法は精製 BoNT に対してはマウス法に匹敵する検出感度を示すが、検体に夾雑物が存在する場合、検出感度が大きく低下するので、この点の改良が必要である。

A. 研究の目的

ボツリヌス神経毒素 (BoNT : Botulinum neurotoxin) は、自然界に存在する最強のタンパク質毒素であり、バイオテロで使用されうる物質として警戒されている。BoNT は、動物の神経細胞に取り込まれて SNARE と呼ばれる 3 種のタンパク質を切断する。SNARE タンパク質が切断されると神経細胞は神経伝達物質を放出できなくなり、神経遮断による致死的な麻痺症状が起こる。BoNT には A から G の 7 種の血清型が知られており、作用する SNARE タンパク質は異なっている。A、C、E 型の BoNT は、SNAP25 と呼ばれる SNARE を切断し、B、D、F、G 型は synaptobrevin を切断

する。C 型の BoNT は syntaxin も切断する。

BoNT の簡便、迅速検出法の整備は、バイオテロ対策として有効な手段であると考えられる。現在、最も信頼される BoNT 検出法は、マウスを使用する方法であり、検体をマウスに注射し、BoNT による麻痺症状が出現するかを観察する。検出感度は 1 マウス LD₅₀/ml 程度 (ヒトの致死量の約数万分の 1 : 精製した A 型 BoNT の場合、約 5~100 pg) であり、数時間から 1 日で検査できる。しかし、実験動物設備が必要であり、実施できる環境には制限がある。また、実験動物削減の観点からも、マウスを使用しない検査法が求められている。

本研究計画では、マウスを使用しない BoNT 検出法の確立を目指して、BoNT のエンドペプチダーゼ活性を簡便に検出する方法を検討した。

B. 研究方法

1) BoNT の活性を検出するために、SNARE の組換えタンパク質を生産し、BoNT 検出用の基質とした。2) 組換えタンパク質基質を利用した反応系で、精製 BoNT の検出感度を検討した。3) 実際に検査法として有効か検証した。

C. 研究結果

1) SNAP25 と synaptobrevin を含む基質タンパク質のデザインと生産

SNAP25 と synaptobrevin は BoNT による切断が詳しく解析されているマウスのものを利用した。マウスの SNAP25 は 206 個、synaptobrevin は 116 個のアミノ酸からなるが、SNAP25 は 71- 206 番目の配列部分、synaptobrevin は 31- 92 番目の部分を使用した。これらに対応する cDNA をタカラバイオ社の pCold ProS2 または、pCold GST 発現ベクターに挿入し、さらに蛍光タンパク質 EYFP の遺伝子を連結した。(図 1. A.) これらが大腸菌に導入して、組換え基質タンパク質 ProS2-HS と GST-HS を得た(図 1. B.)

2) A、B、E、F 型の BoNT による基質タンパク質の切断実験

ProS2-HS と GST-HS について、A、B、E、F 型の精製 BoNT による切断実験を行った。毒素量は 10^2 および 10^3 マウ

ス LD₅₀/ml の濃度で検討した。基質と BoNT の反応条件は昨年度の本研究の報告書と同条件にした(反応液組成: 20 mM HEPES-HCl pH 7.0, 2.5 mM DTT, 20 μ M ZnCl₂, 0.2 % ゼラチン)(基質タンパク質濃度 5 μ g/ml)(反応時間 37、2 時間)。基質切断の確認はアジレント・テクノロジー社の Agilent 2100 バイオアナライザーと High Sensitivity Protein 250 キットで行った。その結果、ProS2-HS と GST-HS は、切断産物のサイズから、いずれの型の BoNT でも、報告されている切断部位で切断がおきていると考えられた(図 2)。しかし、ProS2-HS は GST-HS に比べて、B 型の BoNT による切断パターンに乱れがあり、毒素量が 10^3 マウス LD₅₀/ml では、切断が起こっていなかった。このため、以後の実験には GST-HS を使用した。

また、C、D、G 型の BoNT については感染研で精製毒素を所持していないため、実験を実施しなかった。

3) 精製 BoNT 検出感度の測定

GST-HS を使用した検出系がどの程度の量の精製 BoNT を検出できるか、検出感度を検討した(図 3)。その結果、A 型、E 型の精製 BoNT の場合は 4 マウス LD₅₀/ml でも検出可能だった。E 型、F 型の場合は 16 マウス LD₅₀/ml 程度まで検出された。この検出に必要な時間は 3 時間程度だった。マウス法の場合、3 時間で BoNT 活性が検出されるのは、数十マウス LD₅₀/ml 以上の比較的高濃度の BoNT が接種された場合であり、GST-HS 法は精製 BoNT に対しては、マウス法に匹敵

する検出感度があると考えられた。

4) 検出系としての有効性

ボツリヌス菌の純培養液上清には、通常、数万～数十万マウス LD₅₀/ml の BoNT が含まれる。ボツリヌス菌の検査時には、マウス法によってこれらは容易に検出される。GST-HS による検出法も培養液中の BoNT を検出できるか検討した。しかし、A 型と B 型の BoNT 産生菌の培養上清について BoNT 検出を試みたところ、GST-HS 基質に分解が生じてしまい BoNT の検出が行えなかった(図 4)。これはボツリヌス菌が生産する BoNT 以外のプロテアーゼによって GST-HS 基質が壊されてしまったためと考えられた。反応液にプロテアーゼ阻害剤 (Thermo scientific 社の Halt™ Protease Inhibitor Cocktail EDTA-Free) を加える検討も行ったが、GST-HS 基質の分解を抑えることはできなかった。

D. 考察

ボツリヌス症の診断では、ボツリヌス菌や遺伝子の検出も重要な検査情報になるが、最終的な判定を下す上で最も大きな情報は BoNT 活性そのものの検出である。万が一、ボツリヌス菌、BoNT がバイオテロに使用されるよう事態が発生した場合でも同様のことが言える。BoNT 活性の検出が正確な事態把握の重要な根拠になる。

今回、全ての型の BoNT の基質になる組換えタンパク質 GST-HS を作製し、BoNT 検出系を構築した。今回デザインした方法は、精製 BoNT であればマウス

法に匹敵する感度で、迅速、簡便に BoNT を検出できた。これは、美容や医療用途で使用されている精製 BoNT 製剤の確認、検査の目的には有用なレベルだと考えられる。しかし、GST-HS 法は、マウス法では容易に検出できるボツリヌス菌培養上清中の BoNT が検出不能だった。培養上清に存在するプロテアーゼのためであり、検体中の夾雑物が大きな問題になった。マウス法の優れている点は、BoNT に対する高感受性に加えて、マウスの生理機能に大きな影響を与えない夾雑物であれば、その影響を排除して特異的に BoNT が検出されることである。

ボツリヌス症の診断では患者便や吐物、血清、食品などの検体から BoNT の検出が行われるが、バイオテロのような事例では、おそらく、さらに様々は検体から BoNT 検出が必要になる。実際に有効な BoNT 検査法の構築には、検体中の夾雑物の除去、またはその影響の排除が大きな問題点になる。マウスの体内で神経細胞内に BoNT が取り込まれるような特異性で、夾雑物中から微量な BoNT を抽出する手法と、今回作製した GST-HS 法のような簡便で高感度な方法が組み合わせられれば、マウスを使わない実用的な BoNT 検出法が実現できる。

E. 結論

SNAP25 と synaptobrevin を含む組換えタンパク質を生産し、全ての血清型の BoNT を簡便、迅速に検出できる方法をデザインした。この方法の精製 BoNT に対する検出感度は、マウス法に匹敵したが、夾雑物による影響を受けやすいので、

検体中の夾雑物の影響を除去する手段の
開発が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

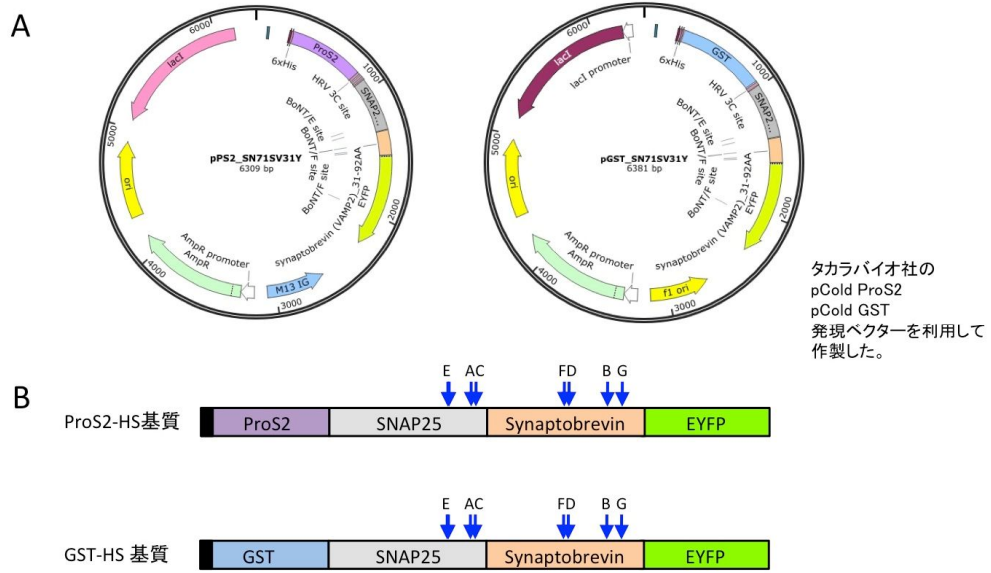
なし

2. 学会発表

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定
を含む）**

なし



タカラバイオ社の
pCold ProS2
pCold GST
発現ベクターを利用して
作製した。

図1. A. 基質タンパク質の生産に使用した発現プラスミド
B. 発現される基質タンパク質の構造および BoNT による切断部位の模式図

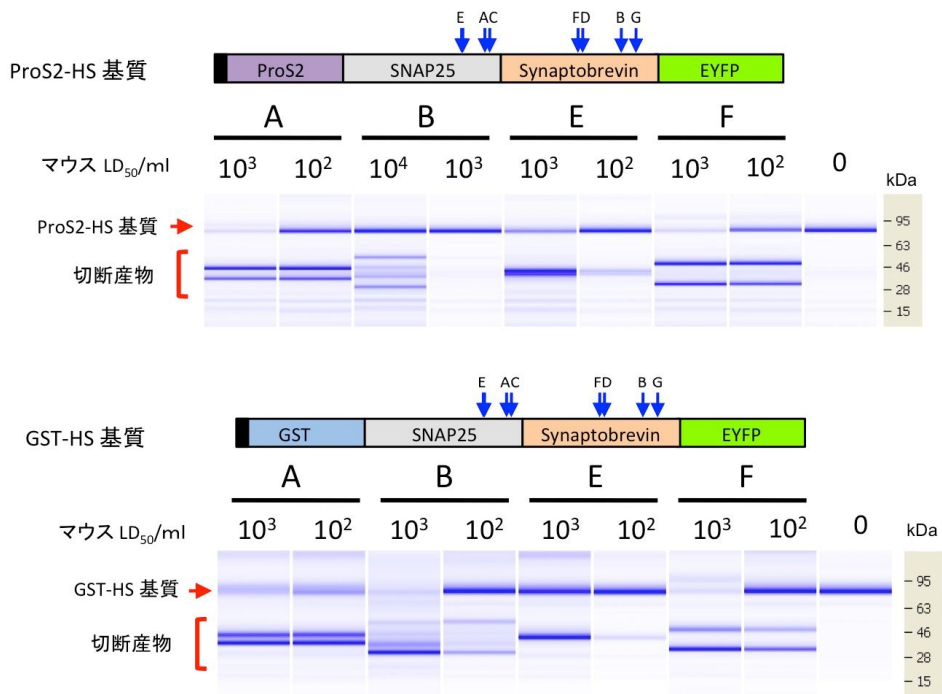


図2 BoNT (A、B、E、F 型) による組換えタンパク質基質の切断実験

