岡山医学会雑誌　第117巻　May 2005, pp. 41-46

原　著

ボツリヌスC型，D型毒素遺伝子の解析による菌の分類に関する研究

阪口義彦

岡山大学大学院医歯学総合研究科　病原細菌学
（指導：小熊惠二教授）

Studies on classification of *Clostridium botulinum* types C and D strains based on genetical analysis of C and D toxin genes

Yoshihiko Sakaguchi

Department of Bacteriology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama 700-8558, Japan
(Director : Prof. K. Oguma)

Clostridium botulinum types C and D toxin production is governed by the specific bacteriophages. A type C phage, c-st, was isolated from a toxigenic strain of C-Stockholm, and its whole genome sequence was determined. The genome was a linear double-stranded 185,681bp DNA with a G+C content of 26.2%, and identical 403-bp sequences were found at each end of the genome. From the DNA research, 198 potential protein-coding regions (ORFs) were identified. The genes for type C progenitor toxin and C3 exoenzyme were identified, but no type D toxin gene was found. A number of genes were homologous to those of a *Bacillus subtilis* bacteriophage, SPβ. On Southern blot analysis between type C and D cell DNAs and the specific probes for H and L chains of C and D neurotoxins, it became clear that type C and D strains posses only one type of toxin gene. From these findings, it is concluded that cross-neutralization observed between toxins (types C and D) and their antiserums can be caused by the common-antigens in C and D toxins.

キーワード：ボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*），ファージ（phage），神経毒素遺伝子（neurotoxin gene）

緒　　言

ボツリヌス菌は，毒素の抗原性によりA～G型に分類されている．これらの菌から産生されるボツリヌス神経毒素（neurotoxin；NTX)は，培養液中や食品中では無毒成分と結合して巨大な複合体（progenitor toxin；PTX）として存在する．PTXには，12S毒素（分子量約30万），16S毒素（分子量50万），19S毒素（分子量90万）の3種類が，無毒成分には赤血球凝集活性を示すヘマグルチニン(hemagglutinin；HA）と示さない non-toxic non-HA（NTNH）（分子量約14万)が存在する．12S毒素はNTXにNTNHが，16Sと19S毒素は12S毒素にさらにヘマグルチニンが結合したものであるが，A型菌は19S毒素，16S毒素，12S毒素の3種類の毒素を，B，C，D型菌は12Sと16S毒素を，E，F型菌は12S毒素のみを，G型菌は16S毒素のみを産生する[1]．NTXは，菌体内ではジスルフィド結合を有する1本鎖ポリペプチドとして産生され，プロテアーゼやトリプシンなどにより特定の部位に切れ目（nick）が入り，約10万の重鎖（heavy chain；H鎖）と約5万の軽鎖（light chain；L鎖）の2本鎖ポリペプチド（di-chain form；2本鎖構造）となる（ただし，両者は1個のジスルフィド結合で連結されている）．

ボツリヌスA～F型菌は，1種類以上のファージより感染（溶原化）されている[2-4]．G型菌もファージ様粒子を所有する[5]．興味深いことに，これらの血清（A-G）型の中で，C型，D型菌においてのみ，その毒素産生性が宿主特異性バクテリオファージによって支配されている[6-9]．飯田らおよび小熊らは，C型およびD型菌毒素産生株であるC-StockholmとD-1873より得たファージをc-stおよびd-1873ファージと名付け，これらのファージを，同じ有毒株からアクリジンオレンジ処理により得た無毒株である(C)-AO2と(D)-139，(D)-151にそれぞれ感染させると，無毒

平成16年12月7日受理
〒700-8558　岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7158　FAX：086-235-7162
E-mail：gme11010@cc.okayama-u.ac.jp

株は毒素産生株へと変換されることを認めた．

他方，C型とD型菌の分類は歴史的に混乱をきたしている．抗Cと抗D型毒素抗体とC型およびD型毒素との間で中和試験を行うと，同じ型の抗体と毒素の間でも中和されにくい毒素が存在する．さらには，抗C型抗体はD型毒素を，また，抗D型抗体はC型毒素をさまざまな割合で交差中和する．このようなことから，以前は，1種類のC型あるいはD型菌が，C型とD型の2種類以上の毒素をいろいろな割合で産生すると結論された．この問題を解決するために，小熊らはC型とD型毒素およびそのH鎖とL鎖を精製し，これらに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製した．これら抗体と毒素との反応を解析することにより，各毒素間には共通抗原が存在すること，そして，この共通抗原の差により（交差）中和の割合が決定されるという結論を得た[10-14]．彼等は，無毒株(C)-AO2をc-stファージにより感染させ有毒株へと変換された菌AO2(c-st)より粗毒素を精製し，これに対する抗血清も作製した．この抗体とC型とD型毒素との中和実験を試み，抗体は，精製毒素とその抗体の場合と同様に，D型毒素を交差中和することも報告している[10]．

今回，上記の問題点，すなわち，1種類の菌には1種類の毒素遺伝子だけが存在するのか，あるいは2種類以上の毒素遺伝子が共在するのかという点を明確にするため，1）c-stファージの全塩基配列決定，2）C型とD型毒素遺伝子に対する特異的プローブと有毒および無毒の菌体宿主染色体との間でのサザンブロット解析，を行うことにより検討した．

材料と方法

1．c-st ファージ DNA の精製

C型ボツリヌス菌（有毒株）のC-Stockholm から誘発したc-stファージを，LYG培地（1％ラクトアルブミン水解物，2％酵母エキス，0.5％グルコース，0.15％L-システイン塩酸塩-水和物（pH 7.2））により培養したC型ボツリヌス菌由来無毒株（C)-AO2に感染させた．溶菌後，培養液にRNase (DNase-free) とDNase I (RNase-free) を添加し，37℃で30分間処理した．その後，1M NaClを添加し，4℃で16時間置いた．その液を11,000×g，4℃で20分間遠心し，培養上清に10％ポリエチレングリコール#8,000を添加し，4℃で一夜置いた．それを4℃で10分間，11,000×gで遠心し，得られた沈殿物をトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で懸濁した後，pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) アガロースプラグに包埋した．その後，アガロースプラグを0.1％プロテイナーゼKと0.5％N-ラウロイルサルコシンナトリウム存在下，50℃で24時間処理し，CHEF MAPPER (Bio-Rad) を用いてPFGE解析を行った．

2．c-st ファージゲノムの塩基配列の決定

ランダムショットガンライブラリーは以前に報告された方法で作製した[15]．c-st ファージ DNA は PFGE により分離し，186 kbp のバンドを切り出し，Prep-A-Gene DNA 精製キット (Bio-Rad) を用いて精製した．精製したDNAは超音波発生装置により1～2 kbp の小さな断片にし，BAL31エキソヌクレアーゼ（TaKaRa Biomedicals）で処理し，次にT4 DNA ポリメラーゼ(TaKaRa Biomedicals)で反応させた後，その断片を精製した．精製後の断片を *Sma* I 消化と bacterial アルカリホスファターゼ(Pharmacia Biotech）で処理された pUC18クローニングベクターに連結させ，その反応物を *E. coli* DH 5 α にトランスフォームした．生成したコロニーを96-ウエル マイクロプレートで一夜培養し，その培養液を Thermocycler（Biometra）でプライマー（LF；5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3'，LR；5'-TCCGGCTCGTATGTTGTGTGG-3'）と Ex Taq ポリメラーゼ（TaKaRa Biomedicals）を用いて，96℃で1分40秒間の変性後，96℃で20秒間，55℃で2分間，70℃で2分間を30サイクル行い，さらに，70℃で10分間伸長させる条件で polymerase chain reaction (PCR) を行い，挿入された DNA 断片を増幅させた．その後の反応液をエキソヌクレアーゼIとShrimpアルカリホスファターゼ（Amersham Life Science）で消化し，それをDNAシークエンス反応の鋳型とした．シークエンス反応は，-21M13ユニバーサルフォワードプライマーとPrism Dye terminator サイクルシークエンシングキット FF または FS (Applied Biosystems)，dye terminator chemistry を用いて行った．配列の解析は，ABI Prism 377または373Aオートシクエンサー（Applied Biosystems)，Megabase 1000 sequencing machines を用いた．得られた配列の情報は，SEQENCHER DNA sequencing ソフトウェア(version 3.0, Gene Codes)により構築させた．contig間のギャップ領域は，選び出した PCR 産物を鋳型としてカスタムプライマーとリバースプライマー（5'-GTGTGGAATTGTGAGCGG-3'）を用いて，walking method を適用した．

3．c-st ファージゲノムの両末端配列の決定

c-st ファージゲノムの制限酵素切断地図に基づいて，c-st ファージ DNA の右末端配列の決定には *Nru* I と *Nhe* I，左末端配列の決定には *Sal* I で消化し，その断片を PFGE により分離，精製した．その精製断片を材料と方法の2で述べたのと同様の方法で，ランダムショットガンシークエンシングを行った．

4．コンピュータ解析による ORF の推定

読み枠は GENOME GAMBLER プログラムを用いて推定した．この解析により，198個の ORF が確定された．推定されたタンパク質の配列は，DDBJ での BLAST と FASTA プログラムを用いて，相同性検索を行った．

5．G＋C含量の計算

ゲノム塩基配列におけるG＋C含量を計算した．Window サイズを1,000bp とし，各 window ごとのG＋C含量を計算し，グラフ上にプロットした．Window のスライド幅は100bp とした．

6．サザンハイブリダイゼイション

C-Stockholm と(C)-AO2, D-1873, (D)-139, (D)-151の菌をクックドミート培地を用いて37℃で一夜培養した後，4℃で10分間，8,000×g で遠心し集菌した．これをトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で懸濁し，4℃で10分間，8,000×g の遠心を2回繰り返し菌を洗浄し，洗浄した菌をトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に再懸濁し，PFGE アガロースプラグに包埋した．作製したアガロースプラグを1.2g/L リゾチームと0.5%N-ラウロイルサルコシンナトリウムの存在下，37℃で16時間処理した．洗浄後，アガロースプラグを1 g/L プロテイナーゼKと0.5%N-ラウロイルサルコシンナトリウム存在下，50℃で24時間処理した．精製したそれぞれのアガロースプラグを *EcoR* I または *Hind* III で消化し，電気泳動により分離した．それを Nytran ナイロンメンブラン（Amersham Pharmacia Biotech）に転写させた．

一方，C型とD型毒素遺伝子のL鎖とH鎖のそれぞれ特異的な配列を増幅するため，4対のプライマーセット（C型L鎖は CL-f：TGCCAATAACAATTAACAACTTTAATT と CL-r：TATTGCTTTATGACAAAATTTTGTAAATA，C型H鎖は CH-f：TGAAGAAGGCGATGTTCAGCTTAA と CH-r：CTCCTCGTACTCTAGTATCATTTG，D型L鎖は DL-f：ATGACATGGCCAGTAAAAGATTTTAA と DL-r：TCTACTATTTTTTGTTAATCTTAAACATA，D型H鎖は DH-f：TGAGAACTCTAGTGTTAGTTTTTGG と DH-r：CCTAAAACTAGAGAAAATTTGACTAC）を作製し PCR を行った．得られた PCR 産物を QIAquick ゲル抽出キット（QIAGEN）を用いて精製した．これをグルタルアルデヒド溶液と DNA 標識試薬（Amersham Biosciences）を用いて DNA 標識し，プローブ（CL, CH, DL, DH）とした．断片化させた菌のゲノム(DNA)を転写させた Nytran ナイロンメンブランに，標識したプローブを42℃で一夜ハイブリダイズさせ，ECL 検出試薬(Amersham Biosciences)を用いて検出した．

結　果

1．c-st ファージゲノムの全塩基配列の決定

全ゲノムランダムショットガンシークエンシングを行ったところ，c-st ファージゲノムの全塩基配列は，185,681 base pairs (bp)の線状2本鎖 DNA で，ゲノムの両末端には403 bp の末端直列反復配列（TDR）が存在することが判明した（図1，図2）．rRNA をコードする遺伝子は存在していなかった．G＋C含量は，26.2%で宿主ゲノムと類似して著しく低かった（図3）．また，c-st ファージゲノム上には，G＋C含量の高い領域が見つからなかった．

2．c-st ファージゲノムのアノテーション

c-st ファージゲノム上の全ての5つの読み枠において，50コドンより長い遺伝子と開始コドンを ATG, GTG, TTG からなる遺伝子を読み枠（ORFs）として解析した．それぞれの ORF はリボゾーム結合配列の存在下で，DDBJ のデータベースにより BLAST と FASTA を用いて相同性を調べた．この方法において，botR，C型神経毒素，hemagglutinin (HA), non-toxic non-HA (NTNH), C3 exoenzyme を含む198個の推定した有意なタンパク質をコードする領域を確定した．機能が推定できていないが，機能不明の既知タンパク質と相同性がある，いわゆる conserved hypothetical protein の遺伝子が15種類存在していた．これらの ORF は *Bacillus subtilis* の SPβ ファージゲノム上の ORF と高い相同性を示した．

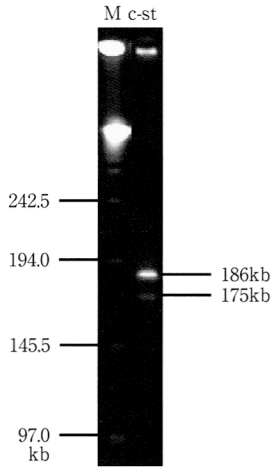

図1　c-st ファージ DNA の PFGE 解析
PFGE は CHEF MAPPER (Bio Rad) を用いて，以下の条件で行った．電気泳動バッファー；0.5Xトリス-ほう酸-エチレンジアミン四酢酸2ナトリウム，電圧；6.0V/cm reorientation, アングル；120，パルス時間；linearly increased from 6.57 to 15.54s，泳動時間；34時間47分，温度；14℃．M；分子量マーカー，c-st；c-stファージ DNA．

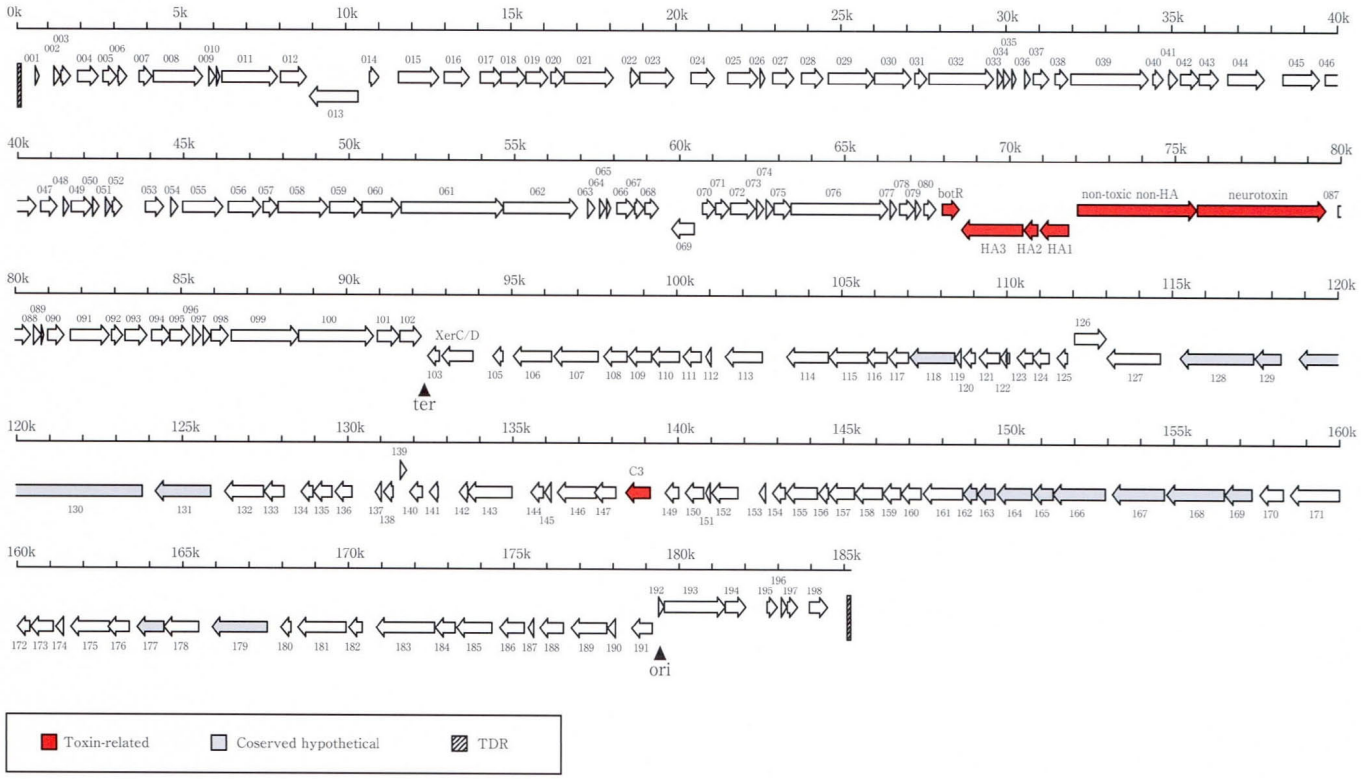

図２　c-st ファージゲノムの遺伝子構成
ボックスは ORF を，ボックス上または下の番号は ORF 番号を示している．線の上または下に示している ORF は，それぞれ左から右，右から左に転写される方向である．推定した ORF の機能は３つのグループに分類し，同じグループの ORF は同じ色で示している．斜線で示したボックスは，403bp の末端直列反復配列（TDR）である．また，ori と ter の位置も示した．ori は複製起点，ter は複製終結点を示す．

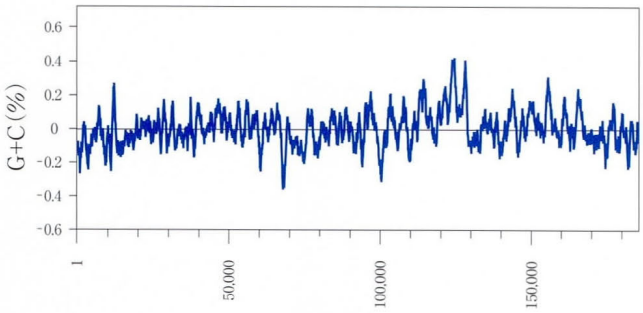

図３　c-st ファージゲノムにおけるＧ＋Ｃ含量
横軸はファージゲノム全長を表す．青色の線は GC 含量を示す．ori は複製起点，ter は複製終結点を示す．

３．Ｃ型とＤ型神経毒素遺伝子の分類

上記の結果から，c-st ファージゲノム上には１種類のＣ型毒素遺伝子のみ存在することが明らかとなったが，Ｃ型とＤ型ボツリヌス菌のゲノムやプラスミド上に存在する毒素遺伝子数（種類）の問題については未解決のままである．そこで，Ｃ型とＤ型毒素遺伝子のＬ鎖とＨ鎖にそれぞれ特異的な４つのプローブ CL，CH，DL，DH を作製し，宿主ゲノムを用いてサザンハイブリダイゼイションを行った（図４）．CL と CH では，C-Stockholm にのみ強いシグナルが得られたが，(C)-AO2 や D-1873，(D)-139，(D)-151にはシグナルが検出されなかった．また，DL と DH では，D-1873にのみハイブリダイズし，他の菌体のゲノム(DNA)には反応しなかった．CL において，C-Stockholm-DNA の *Hind*Ⅲ消化 DNA 断片にのみ２本のシグナルが検出された理由は，作製した CL の位置に *Hind*Ⅲ部位があることより，DNA が2.7kb と5.8kb の２本に断片化されためであった．また，DL では，D-1873の DNA を *Hind*Ⅲ消化した DNA 断片にのみ，３本のシグナルが検出された．これは，1.2kb と1.9kb，６kb の３つに断片化されるためであった．1.2kb のシグナルに比べて1.9kb と６kb のシグナルが弱い理由は，DL がハイブリダイズする領域が極めて少ないことに由来する．これらの結果から，Ｃ型菌にはＣ型毒素遺伝子が，Ｄ型菌にはＤ型毒素遺伝子がそれぞれ一種類ずつしか存在しないことが明らかとなった．

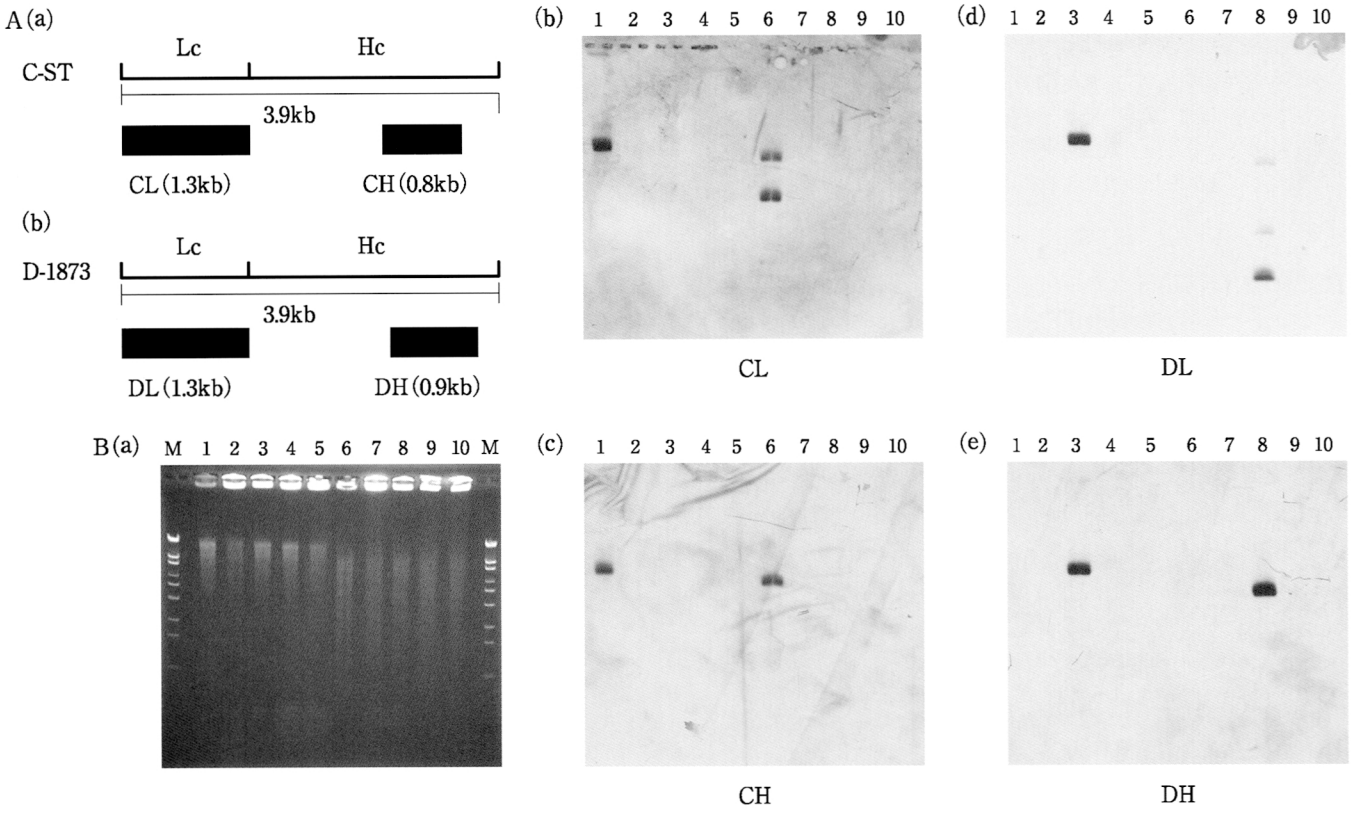

図4　サザンブロットハイブリダイゼイション
A；毒素遺伝子の構造とC型毒素遺伝子(a)とD型毒素遺伝子(b)のプローブの位置．CLはC型毒素遺伝子のL鎖，CHはC型毒素遺伝子のH鎖，DLはD型毒素遺伝子のL鎖，DHはD型毒素遺伝子のH鎖のプローブを示している．B；サザンブロットハイブリダイゼイション．C-Stockholm，(C)-AO2，D-1873，(D)-139，(D)-151のDNAをそれぞれ*EcoR* Iまたは*Hind* III消化した．このDNA断片をアガロースで電気泳動し，アガロースを臭化エチジウムで染色した(a)．C型，D型菌の染色体とC型，D型毒素遺伝子のH鎖，L鎖の上記プローブ，CL(b)，CH(c)，DL(d)，DH(e)，との間でサザンブロットハイブリダイゼイションを行った．レーン1と6；C-Stockholm，レーン2と7；(C)-AO2，レーン3と8；D-1873，レーン4と9；(D)-139，レーン5と10；(D)-151．レーン1～5；*EcoR* I消化，レーン6～10；*Hind* III消化．

考　　察

多くの研究者により，それぞれの血清型において，神経毒素をコードする遺伝子の全塩基配列が決定されている[16]．近年，小熊らは神経毒素遺伝子の他，それに付随する無毒成分遺伝子（HA，NTNH）の塩基配列を決定し，各々の構成成分の構造と機能を明らかにした[16,17]．また，c-st ファージゲノム上には，神経毒素や無毒成分の遺伝子の他，C3 exoenzyme 遺伝子も存在することが知られている[18]．これ以外の本ファージの性状についてはこれまで殆ど明らかとされていなかったが，今回，我々は初めてc-st ファージゲノムの全塩基配列を決定し，本ファージの様々な特徴を明らかにすることに成功した．

今回，我々はc-st ファージにはC型毒素遺伝子しか存在しないことを確証するとともに，C-Stockholm およびD-1873には，それぞれC型とD型毒素遺伝子しか存在しないこと，無毒株である（C)-AO2，(D)-151，(D)-139には毒素遺伝子は存在しないことをサザンハイブリダイゼイションにより明らかにした．従って，歴史的に混乱をきたしていた交差中和の原因は，1種類の菌が2種類の毒素遺伝子を持つのではなく，C型とD型毒素の共通抗原によるものであることが確証された．

結　　論

C型ボツリヌス毒素遺伝子を支配しているファージゲノムの全塩基配列を決定した．本ファージのゲノム上には既知の遺伝子であるbotR，C型神経毒素，HA，NTNH，C3 exoenzyme を含む198個の ORF が存在したが，D型毒素遺伝子は認められなかった．サザンブロット解析からは，C型とD型有毒株には，それぞれ各1個の毒素遺伝子が存在するが，無毒株には毒素遺伝子が存在しないことが示された．これらのことから，C型菌およびD型菌が有する毒素遺伝子の分類上での問題点が解消された．

謝　　辞

本稿作成にあたり，ご指導ならびにご高閲を頂いた小熊惠二教授，また，共同で実験およびご指導を頂いた林　哲也教授，黒川　顯助手，大西　真助手，村田敬寛助手，中山恵介助手に，さらに，研究を支援して頂いた日本学術誌振興会の未来開拓研究事業に深く感謝致します．

文　　献

1) Sakaguchi G : in Microbiological toxins in food and feeds, Pohaland AE, Dowell VR, Richard JL, eds, Plenum Press, New York (1990) pp 173-180.
2) Inoue K, Iida H : Bacteriophages of *Clostridium botulinum*. J Virol (1968) **2**(**5**), 537-540.
3) Eklund MW, Poysky FT, Boatman ES : Bacteriophages of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F and nontoxigenic strains resembling type E. J Virol (1969) **3**(**2**), 270-274.
4) Dolman CE, Chang E : Bacteriophages of *Clostridium botulinum*. Can J Microbiol (1972) **18**(**1**), 67-76.
5) Eklund MW, Poysky FT, Mseitif LM, Strom MS : Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G. Appl Environ Microbiol (1988) **54**(**6**), 1405-1408.
6) Eklund MW, Poysky FT, Reed SM : Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type D. Nat New Biol (1972) **235**(**53**), 16-17.
7) Oguma K, Iida H, Inoue K : Bacteriophage and toxigenicity in *Clostridium botulinum* ; an additional evidence for phage conversion. Jpn J Microbiol (1973) **17**(**5**), 425-426.
8) Oguma K, Iida H, Shiozaki M, Inoue K : Antigenicity of converting phages obtained from *Clostridium botulinum* types C and D. Infect Immun (1976) **13**(**3**), 855-860.
9) Hariharan H, Mitchell WR : Observations on bacteriophages of *Clostridium botulinum* type C isolates from different sources and the role of certain phages in toxigenicity. Appl Environ Microbiol (1976) **32**(**1**), 145-158.
10) Oguma K, Syuto B, Iida H, Kubo S : Antigenic similarity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. Infect Immun (1980) **30**(**3**), 656-660.
11) Oguma K, Syuto B, Agui T, Iida H, Kubo S : Homogeneity and heterogeneity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. Infect Immun (1981) **34**(**2**), 382-388.
12) Oguma K, Agui T, Syuto B, Kimura K, Iida H, Kubo S : Four different monoclonal antibodies against type C1 toxin of *Clostridium botulinum*. Infect Immun (1982) **38**(**1**), 14-20.
13) Oguma K, Murayama S, Syuto B, Iida H, Kubo S : Analysis of antigenicity of *Clostridium botulinum* type C1 and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. Infect Immun (1984) **43**(**2**), 584-588.
14) Oguma K, Syuto B, Kubo S and Iida H : Analysis of antigenic structure of *Clostridium botulinum* type C1 and D toxins by monoclonal antibodies ; in Monoclonal antibodies against bacteria, vol. II, AJL Macario and EC de Macario eds, Academic Press, New York (1985) pp 159-184.
15) Nakayama K, Kanaya S, Ohnishi M, Terawaki Y, Hayashi T : The complete nucleotide sequence of phi CTX, a cytotoxin-converting phage of Pseudomonas aeruginosa : implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. Mol Microbiol (1999) **31**(**2**), 399-419.
16) Oguma K, Inoue K, Yokota K, Watanabe T, Ohyama T, Takeshi K, Inoue K : J Toxicol-Toxin Rev (1999) **18**, 17-34.
17) Oguma K, Fujinaga Y, Inoue K : Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins. Microbiol Immunol (1995) **39**(**3**), 161-168.
18) Hauser D, Gibert M, Eklund MW, Boquet P, Popoff MR : Comparative analysis of C3 and botulinal neurotoxin genes and their environment in *Clostridium botulinum* types C and D. J Bacteriol (1993) **175**(**22**), 7260-7268.