

氏名	張 凱
授与した学位	博士
専攻分野の名称	医学
学位授与番号	博甲第 4501 号
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)

学位論文題目 *Clostridium botulinum* Type E Toxins Bind to Caco-2 Cells by a Different Mechanism from That of Type A Toxins
(ボツリヌスE型毒素は、A型毒素と異なるメカニズムにより Caco-2細胞へ結合する)

論文審査委員 教授 山田 雅夫 教授 松浦 栄次 准教授 松香 芳三

学位論文内容の要旨

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、強力な神経毒素 (7S、150 kDa) を産生する。この 7S 毒素は食品や培養上清の中では、12S (300 kDa)、16S (500 kDa)、19S (900 kDa) の 3 種類の Progenitor toxin として存在している。12S 毒素は 7S 毒素と赤血球凝集 (hemagglutination ; HA) 活性を示さない無毒成分 (non-toxic non-HA ; NTNH) の複合体であり、16S 毒素は 12S 毒素に HA が結合したものであり、19S 毒素は 16S 毒素の 2 量体である。A 型菌は 3 種の毒素を、E 型菌は 12S 毒素のみを産生する。A 型の 7S 毒素は自分の産生するプロテアーゼにより、軽鎖 (L、約 50 kDa) と重鎖 (H、約 100 kDa) の 2 本鎖構造となる。また、いずれの毒素の H も、N 末端 (Hn) と C 末端 (Hc) の二つのドメインより成る。これまで、A 型毒素は HA あるいは Hc を介して腸管細胞に結合するという異なった報告がなされている。また、12S 毒素のみしか産生しない E 型毒素の結合様式は解析されていないので、本研究では、A 型と E 型毒素の Caco-2 細胞への結合をウェスタンブロット法で調べた。E 型 7S と 12S 毒素はどちらも Caco-2 細胞へ結合できたが、7S 毒素の結合性は 12S 毒素よりも高かった。しかし、A 型毒素では 16S/19S 毒素の結合のみが検出された。E 型毒素の結合ドメインを特定するために、リコンビナントタンパク質として作製した Hc に対する抗体を、7S 毒素と反応させてから結合実験を行ったところ、7S 毒素の結合は顕著に阻害された。以上のことより、A 型毒素は HA を介して、E 型毒素は Hc を介して Caco-2 細胞に結合することが推察された。

論文審査結果の要旨

本研究は、ボツリヌス E 型毒素のヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞への結合について、ボツリヌス A 型毒素の同細胞への結合と比較しながら、解析している。その結果、A 型毒素の場合は、16S/19S 毒素複合体 (7S の神経毒素 NT と赤血球凝集素 HA と、これらを含まない無毒成分 NTNH からなる) の結合のみが検出され、HA を介して腸管細胞に結合するという当該研究グループの知見を確認した。一方、12S 毒素複合体 (7S の神経毒素 NT と NTNH からなる) のみを産生する E 型毒素では、7S の神経毒素と 12S 毒素複合体のどちらも Caco-2 細胞へ結合したが、7S 毒素の結合性は 12S 毒素複合体よりも高かった。さらに、7S 毒素の H 鎖 C 端側 (Hc ドメイン) に対する抗体により 7S 毒素の結合は顕著に阻害された。以上のことより、ボツリヌス E 型毒素は、A 型毒素とは異なり、7S 神経毒素の Hc を介して Caco-2 細胞に結合することが推察された。これらの知見は、12S 毒素複合体のみを産生するボツリヌス E 型毒素の腸管細胞への結合機構について、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。