

感染死を抑制しえる。これらの事実から、STEC 感染に対する個体間の感受性の差異が、血管内皮細胞の Stx 受性差異に起因するのではなく、STEC 感染ストレス誘発 cytokine burst の個体間におけるレベル差に基づくとの仮説を立て、HUS 発症要因の解析をすすめた。

B. 研究方法と結果

1) 供試菌株: *E. coli* 0157:H7 (SM 耐性、Stx1, Stx2 産生) NMU9 株を全ての実験で使用。

2) PDEI による STEC 感染制御実験: 低蛋白栄養 (PCM) C57BL/6 マウス (1mg/L SM 含有水投与) に 2×10^6 cfu 量の NMU-9 株経口感染させ、48 時間後から 3 日間、3 型 (pentoxifylline; 7.5 mg/kg) 及び 4 型 (rolipram; 7.5 mg/kg) PDEI の合剤を 1 2 時間間隔で 1 日 2 回腹腔内投与した。対照群は感染 1 1 日目迄に、全て死亡したが、PDEI 治療群は感染 2 2 日目迄 1 匹 (day 8 に死亡) を除いて全て元気に生存し、有意な生存効果 ($p < 0.001$) が得られた (図 1 A)。治療群マウスでは、血中の Stx2 が感染 8 日目迄検出レベル以下であった (図 2)。同時に感染マウスの脳内 Stx2 を免疫染色で検索したところ、治療群では検出できず、対照群では特に海馬部に免疫沈降が顕著であった (図 1 B) 血中炎症性サイトカインの中で TNF- α , IL-1 β , IL-6 は、感染 3—6 日の間対照群に比して有意に低値であったが、IL-10 のみ治療群で高値を呈した (図 3)。回

盲部上皮細胞を分離し、感染 4, 6 日目における上皮細胞結合 Stx2 を定量したところ、治療群では有意に低値であった (表 1)。PDEI 投与による脳症発症抑制が、炎症性サイトカインの産生抑制と併行していることが、確認された。

図 1 A

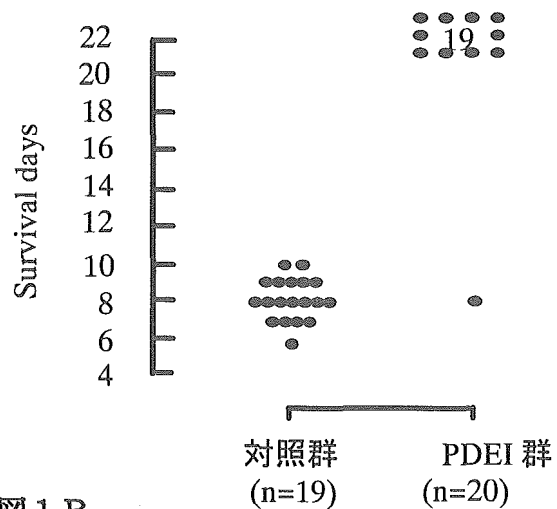


図 1 B



図 2

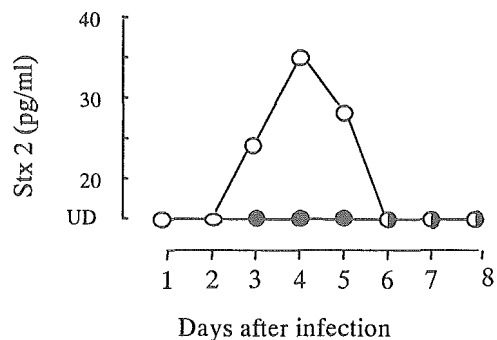


図 3

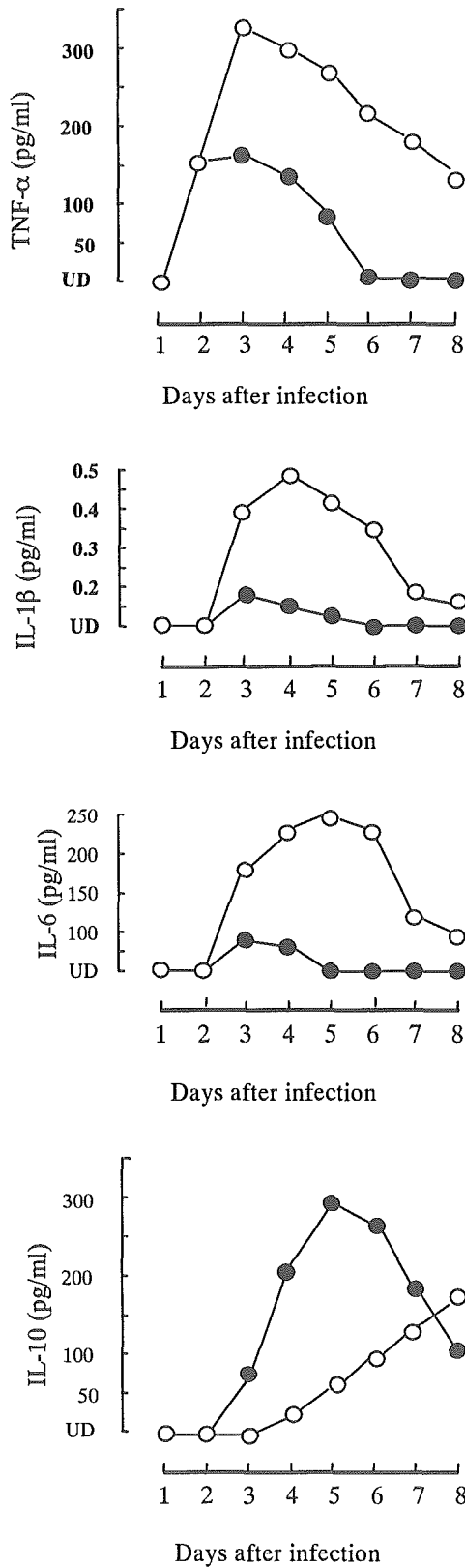


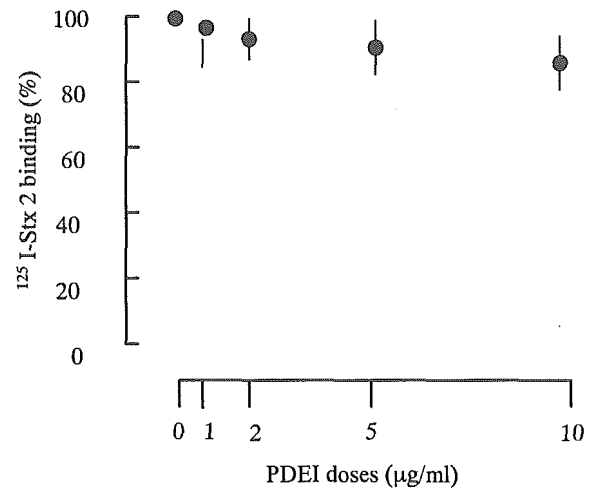
表 1 腸管上皮細胞内 Stx2 量の比較

Groups of mice	Cell-bound Stx2 (pg/5 × 10 ⁸ cells)	
	Day 4	Day 6
治療群	358.6 ± 44.2	482.8 ± 53.6
対照群	153.5 ± 32.6	92.4 ± 28.9

3) PDEI 処置血管内皮細胞 (HUVEC) および腸管上皮細胞 (Caco2) に対する Stx2 の結合解析:

両細胞を PDEI (1-10 μg/ml) 共存下、TNF-α (20 u/ml) で 24 時間活性化し、その後標識 Stx2 を加え 1 時間後の細胞への結合量を比較した。Caco2・HUVEC において、PDEI 前処置で Stx2 結合の有意な低下は見られなかった。

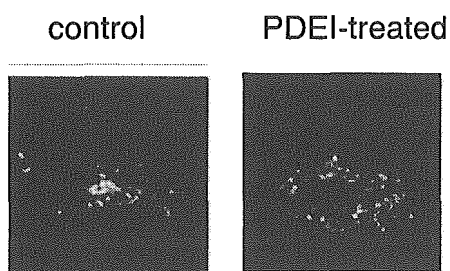
図 4



しかし、同条件下での細胞毒性解析では、PDEI 存在下で HUVEC の細胞死は有意に抑制され (細胞生存率: control = 33.4 ± 9.8%, PDEI treated = 82.6 ± 5.7%, p < 0.005) ていた。Stx2 投与 4 時間後において、PDEI 処理 Caco2 細胞は未処置細胞に比して、細胞内で

の Stx2 の局在が抑制されていることが、免疫染色で判明した (図 5)。さらに、PDEI 処理両細胞の細胞膜より分離した Triton X 不溶性分画中の Gb3 量を TLC-immunoblotting で、半定量解析したところ、両細胞において Gb3 量の減少は認められなかった。

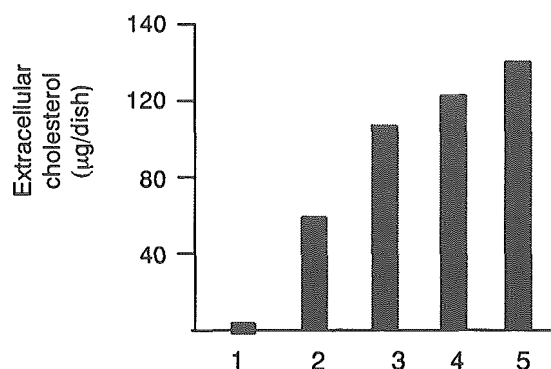
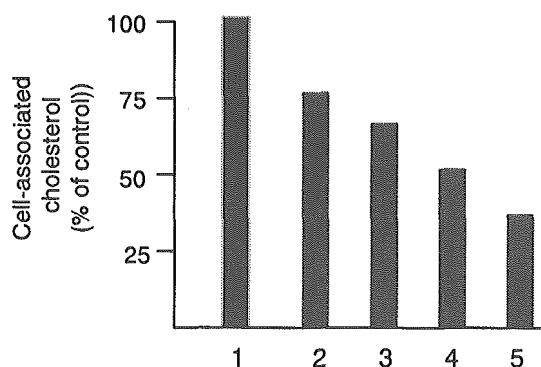
図 5



4) PDEI の Stx2 標的細胞のコレステロール量に与える影響:

両細胞を PDEI (1-10 $\mu\text{g/ml}$) 共存下、TNF- α (20 u/ml) で 24 時間活性化し、細胞外および細胞内のコレステロール量を酵素法により、日立 7350 自動分析装置を用いて測定した。PDEI 濃度に比例して、細胞膜内コレステロール量は減少し、細胞外遊離コレステロール量が増加した (図 6)。

図 6



(1) control cells, cells treated with PDEI at (2) 1 $\mu\text{g/ml}$, (3) 2.5 $\mu\text{g/ml}$, (4) 5 $\mu\text{g/ml}$, (5) 7.5 $\mu\text{g/ml}$,

次に、コレステロール遊離に關与する ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) の PDEI 処理 HUVEC 内での発現を RT-PCR/Southern hybridization で、同細胞膜 Triton X 可溶性・不溶性分画における発現局在を Western blot で検索した。PDEI 濃度に比例して、HUVEC 内での ABCA1 発現は亢進し (図 7 A) したが、同蛋白の局在は Triton X 可溶性膜分画であることが確認された (図 7 B)。

図 7、A

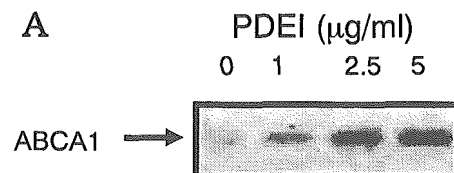
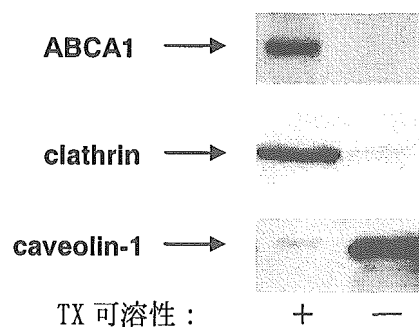


図 7、B



C. 考察

STEC 感染後に生じる HUS はマウスにおいては、急性脳症として表現されることが多く、PCM マウスにおいてその傾向は顕著である。この急性脳症の発症阻止を目的とした PDEI による intervention therapy は、感染後 72 時間目までの開始で、その有効性が認められる。PDEI は cAMP の分解阻止により、TNF- α , IL-1 β , IL-6 等の炎症性サイトカインの産生抑制を招く一方で、IL-10 の産生は増強させる。前者のサイトカインは Gb3 の up-regulation により、標的細胞の Stx 感受性を亢進させるが、後者の炎症性サイトカインは Stx 誘導性アポトーシスに対して、防御的に作用する。細胞膜の脂質代謝の中で、コレステロールの細胞外への遊離を促進する ABCA1 蛋白の発現亢進も、PDEI の重要な薬理さようである。この蛋白の膜局在が lipid raft 中ではなく、non-raft 中であることから、lipid-raft と non-raft 間の脂質平衡の破綻が、恐らく Gb3 の構造変化を招き、結果として Stx の結合性は変化しないものの、その後の Gb3 結合 Stx の internalization が障害されるものと考えられた。

E. 結論

STEC 感染誘発 HUS に対する intervention therapy として、PDEI の有効性が PCM マウス感染モデルで確認し得た。この効果発現解析から、HUS 発症のリスクの差のみならず STEC 感

染に対する宿主感受性の差異に、感染ストレス誘発炎症性サイトカイン産生の差異と、標的細胞膜中の lipid raft と non-raft 間の脂質コレステロール量の平衡異常が関与しているものと推察された。

F. 健康危機情報

STEC 感染の outbreak が起こると、数パーセントの患者で致死性的合併症が生じ得る。現在までのところ、特異的治療法が確立していないこと、さらに PDEI は小児から高齢者まで、多くの疾患で既に臨床応用されていること等から、本薬剤の投与は outbreak 時の危機的状态を軽減するに十分な intervention therapy になり得ると考えられる。

G. 研究発表

平成 17 年度の本研究成果は現在投稿中。

課題名：腸炎ビブリオの菌体表層多糖抗原の解析

分担研究者：近藤誠一 城西大学薬学部病原微生物学講座

協力研究者：一色恭徳 城西大学薬学部病原微生物学講座

研究要旨：

腸炎ビブリオ 06:K18 株と世界的流行株 03:K6 株の菌体表層多糖抗原であるリポ多糖 (LPS) と莢膜 (K 抗原) について、化学構造を主とした解析を行った。06 と 03 の LPS 多糖鎖は、それぞれ 6 種類 9 個及び 7 種 11 個の糖で構成される低分子糖鎖であることを示し、それらの構造をほぼ解明した。また、03 LPS 多糖部には、従来知られていない特殊なアミノ糖が存在することを示した。一方、K6 抗原は 3 種 4 個の糖で構成されるオリゴ糖ユニットが反復重合した高分子の単純多糖であることを明らかにし、その構造もほぼ解明された。

A. 研究目的

腸炎ビブリオは、主に海産魚介類を原因食品とする食中毒の原因菌であり、本菌による食中毒は日本のみならず世界中で多発している。腸炎ビブリオの菌体表層には細胞壁構成成分であるリポ多糖 (LPS) と、細菌細胞を覆って存在する莢膜 (K 抗原) の二種類の多糖抗原が存在し、本菌の腸管への定着と感染成立に寄与する病原因子であると考えられている。腸炎ビブリオの LPS には 13 種類の、また K 抗原には 69 種類の血清型が存在するが、その化学的実体が明らかにされているのは、LPS では 012 と 02 のわずか二つの血清型であり、K 抗原については、主成分が糖質であること以外、化学的性状は未だ不明である。本研究では、これら菌体表層多糖抗原を、本菌の腸管への定着・感染を防止するための感

染防御ワクチンとして応用することを主目的とした研究の基礎的研究として、先ず、LPS と K 抗原の化学的実体を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

1) 供試菌株：腸炎ビブリオ菌株 03:K6 株 (JKY-VP6) は京都大学東南アジア研究センターの西淵光昭教授より、06:K18 株 (V89-129) は東京都健康安全研究センターより分与された。
2) LPS およびその多糖鎖の調製：LPS の調製には、菌株を 3% NaCl 添加普通ブイヨン培地で 37℃、16 時間培養し、加熱殺菌の後、蒸留水、エタノール、アセトンおよびジエチルエーテルで順次洗浄して乾燥菌体としたものを用いた。乾燥菌体から熱フェノール/水法により抽出した LPS 画分を DNase、RNase、proteinase K で順次処理した後、超遠心分離 (10,5000xg, 3 時間)

の反復によって LPS を精製した。LPS を無水ヒドラジンと 50%フッ化水素酸で順次処理して脱 O-アシル化と脱リン酸化し、さらに還元末端をピリジルアミノ化した後、KOH 処理によって脱 N-アシル化して LPS 多糖鎖を調製した。LPS 多糖鎖は N-アセチル化の後、Sephadex G25 ゲルクロマトグラフィーによって分離し、さらに HPLC (カラム: Capcell Pak ODS-AQ、溶離液: 20mM リン酸アンモニウム溶液) によって精製 LPS 多糖鎖 (KOHPS-PA) を得た。また、LPS を 5%酢酸で加水分解し、不溶性のリピド A を除去した後、Sephadex G25 ゲルクロマトグラフィーによってリピド A バックボーンを含まない LPS 多糖部 (PS) を調製した。

3) K6 抗原の調製: K6 抗原の調製には、菌株を 3% NaCl 添加ハートインフュージョン寒天培地上で 37°C、16 時間培養後、菌体を 3% NaCl に懸濁させ、100°C で 2.5 時間加熱して莢膜を遊離させた。遠心分離により得られた粗 K6 抗原は DNase、RNase、proteinase K により順次酵素処理し、Q-Sepharose カラムによるイオン交換クロマトグラフィーと Sephacryl S-300 によるゲルクロマトグラフィーによって精製した。精製 K6 抗原を 5%酢酸中で 100°C、2.5 時間加熱し、遊離した単糖およびオリゴ糖を Sephadex G25 ゲルクロマトグラフィーによって分離した。

3) 分析法: 中性糖とアミノ糖は、常法に従いアルジトール・アセテートとして、あるいは試料をメタノリシス後全アセチル-メチルグリコシドとして

GC および GC-MS によって定性・定量した。FAB-MS には JMS-700 (日本電子) を使用した。¹H-および ¹³C-NMR は、試料を重水溶液とし A-500 (日本電子) を使用して測定した。

C. 研究結果

1) 腸炎ビブリオ 06 LPS の糖鎖構造: 06 LPS は構成糖として D-glucose (D-Glc)、D-galactose (D-Gal)、L-glycero-D-manno-heptose (L,D-Hep)、D-glucuronic acid (D-GlcA)、D-galacturonic acid (D-GalA)、3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) および D-glucosamine (D-GlcN) を含んでいた。06 LPS から脱-アシル化、脱-リン酸化およびピリジルアミノ化によって調製した LPS 多糖鎖 (KOHPS-PA) について構造解析を行った。その FAB-MS 分析 (negative-ion mode) では、 m/z 1809.6 と m/z 1605.6 を示す 2 つの主要分子種が観察された。前者は 3 分子の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、2 分子ずつの hexose (Hex) と heptose (Hep) および 1 分子ずつの hexuronic acid (HexA) と Kdo で構成されるピリジルアミノ化糖鎖 (KOHPS-PA1) の分子量 ($M_w=1809$) と一致していた。後者は、上記 9 個の糖で構成される糖鎖よりも GlcNAc が 1 分子少ないピリジルアミノ化糖鎖 (KOHPS-PA2) の分子量 ($M_w=1605$) と一致し、この糖鎖は KOHPS-PA 調製時にリピド A を構成する GlcN 二量体の切断によって生じた人工産物であることが、後述の NMR 解析によって確認された。HPLC によって KOHPS-PA1 と

KOHPS-PA2 を分離精製し、それらの NMR 解析により糖鎖の構造を検討した。図 1 に O6 KOHPS-PA1 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した。さらに $^{13}\text{C-NMR}$ 、H,H-および C,H-COSY、HMBC、NOESY 測定など

による構造解析の結果、O6 LPS 糖鎖の構造は図 2 に示したように、6 種類 9 個の糖で構成される低分子糖鎖であることが明らかとなった。

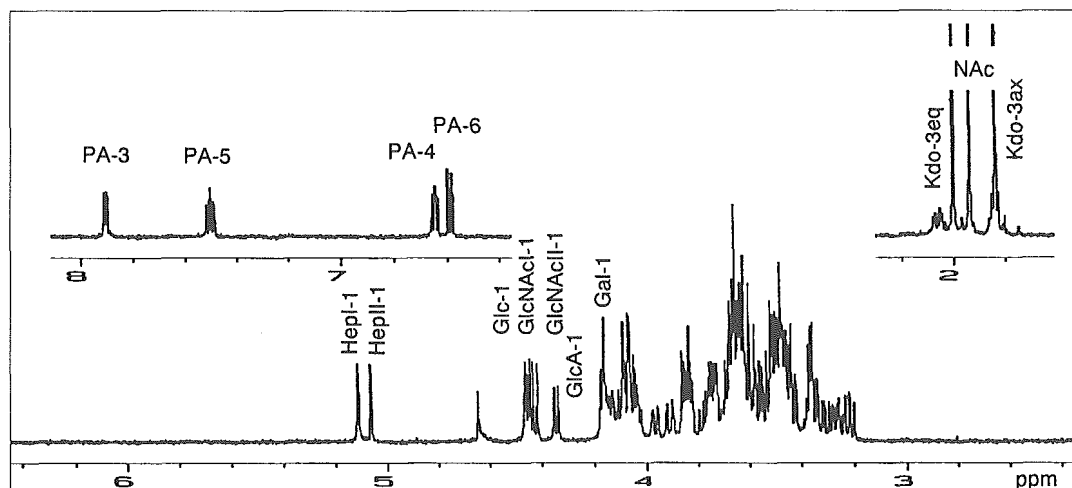


図 1 腸炎ビブリオ O6 の LPS より分離精製したピリジルアミノ化 LPS 糖鎖の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

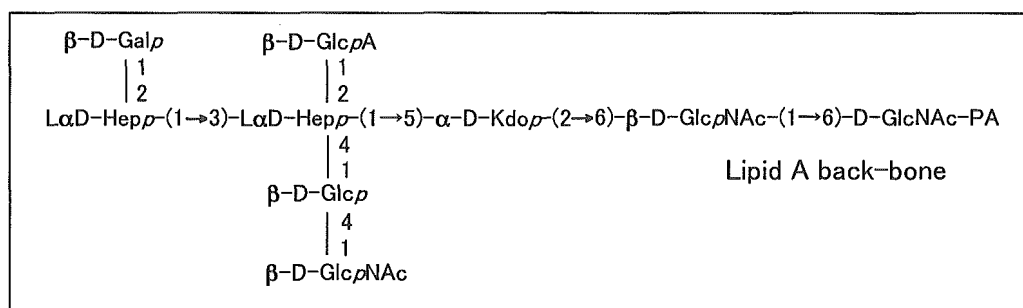


図 2 腸炎ビブリオ O6 LPS より分離精製したピリジルアミノ化 LPS 糖鎖の構造

2) 腸炎ビブリオ O3 LPS の糖鎖構造
2-1) 未同定アミノ糖の解析: O3 LPS をメタノリシス後全アセチル化した試料の GC-MS において、未同定糖が検出された。O3 LPS の多糖部をメタノリシスし、Sephadex G25 ゲルクロマトグ

ラフィーと HPLC によって調製した未同定糖 (NonO3) は、GC-MS と NMR 解析によって 5, 7, 8-triamino-3, 5, 7, 8, 9-penta-deoxy-non-2-ulosonic acid (図 3) であることが明らかとなった。本物質は、著者らがすでに腸炎ビブリオ

02 と OUT 株 LPS の構成糖として報告した 5,7-diamino-3,5,7,9-tetra-deoxy-non-2-ulosonic acid に構造が類似するものの、アミノ基が1残基多く存在し、これまで報告されていない物質であった。本物質の ring conformation の同定は現在進行中である。

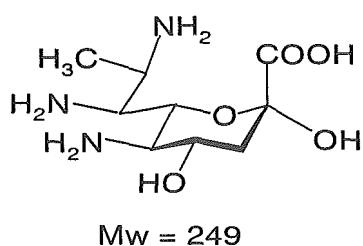


図1 腸炎ピブリオ03 LPS の構成糖として見出された 5,7,8-triamino-3,5,7,8,9-penta-deoxy-non-2-ulosonic acid (Non03) の構造

2-2) 03 LPS の糖鎖構造：03 LPS は構成糖として D-Glc、D-Gal、L,D-Hep、D-GlcA、D-GalA、Non03、Kdo および D-GlcN を含んでいた。リポド A バックボーンを含まない 03 PS の FAB-MS 分析 (negative-ion mode) では、 m/z

1865.6 と m/z 1388.4 を示す 2 つの主要分子種が観察された。前者は 4 分子の Hex、2 分子の Hep、1 分子ずつの HexA、Kdo、Non03 およびリン-エタノールアミン (P-EtN) で構成されるオリゴ糖アンヒドロ体 (PS1) の分子量 (Mw=1386) と一致しており、後者は 3 分子の Hex、2 分子の Hep、1 分子ずつの HexA、Kdo および P-EtN で構成されるオリゴ糖アンヒドロ体 (PS2) の分子量 (1389) と一致していた。すなわち PS2 は PS1 が 1 分子ずつの Non03 と Hex を失った LPS 糖鎖の部分構造物であることが示された。LPS 多糖鎖の各構成糖の結合様式を知るために、03 LPS から脱-アシル化、脱-リン酸化およびピリジルアミノ化によって調製した LPS 多糖鎖 (KOHPS-PA) の NMR 解析を行った。その結果、03 の KOHPS-PA は図 4 に示したように、7 種類 10 個の糖で構成される低分子糖鎖であると推察された。この糖鎖は、03 LPS よりその多糖鎖を調製する際にリポド A バックボーンの GlcN 二量体が切断され、還元末端部の GlcN 1 分子を失った糖鎖であると考えられる。

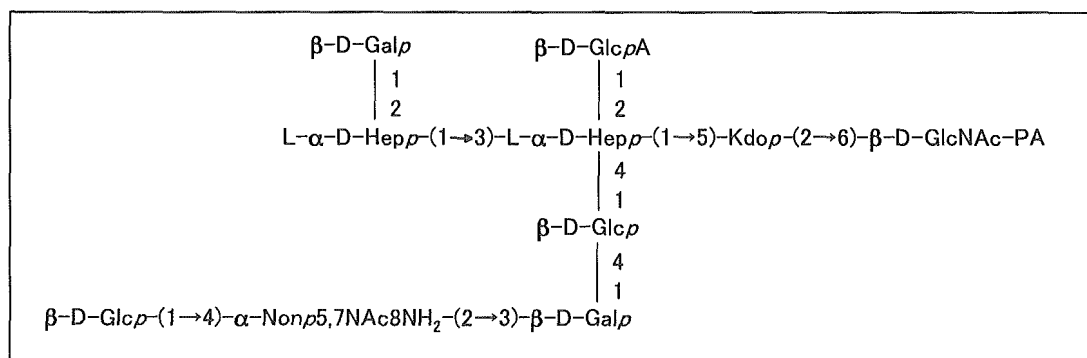


図4 腸炎ピブリオ03 LPS より分離したピリジルアミノ化 LPS 多糖鎖の推定構造

構成されており、これまで構造解析が行われた 012 および 02 の LPS 多糖鎖と同様の低分子糖鎖であった。本研究では、06 と 03 の LPS 多糖鎖の構造をほぼ決定することが出来たが、両者の血清学的特異性を決定するエピトープ構造の解明にはさらに検討が必要である。特に、03 LPS 多糖鎖に新たに検出された未同定アミノ糖 Non03 は、糖鎖の非還元末端近傍に存在し、03 の血清学的特異性に強く関与するものと考えられ、本物質の存在が血清型 03 同定の指標の 1 つになると思われる。06 と 03 の LPS には、構成糖として GalA が検出されるが、LPS 多糖鎖調製の過程で遊離される。同様な性状を示す GalA は他の血清型 LPS にも広く分布しており、GalA は腸炎ビブリオ LPS の血清学的特異性には関与していないと思われる。

腸炎ビブリオの K 抗原は、糖質が主成分であることは以前に報告されているが、本研究で行った解析により、K6 抗原はリピーティング・ユニット構造をもつ高分子単純多糖であることが示された。K6 抗原の構成糖のうち、6-deoxy-hexose については未同定であるが、6-deoxy-idose である可能性が高い。K 抗原は腸管粘膜への付着に関与する因子と考えられ、今後、K6 抗原と腸管粘膜細胞との interaction、特に腸管免疫応答に対する K6 抗原の抗原性の検討に興味を持たれる。

E. 結論

・腸炎ビブリオ 06 の LPS 多糖鎖は、6

種 9 個の糖で構成される低分子多糖である。

・腸炎ビブリオ 03 の LPS 多糖鎖は、7 種 11 個の糖で構成される低分子多糖である。また、従来報告されていない 5,7,8-tri-amino-3,5,7,8,9-penta-deoxy-non-2-ulosonic acid が構成糖として存在する。

・腸炎ビブリオの K6 抗原は、3 種 4 個の糖からなるオリゴ糖リピーティング・ユニットが反復重合した高分子の単純多糖である。

G. 研究発表（学会発表）

- 1) 一色恭徳、近藤誠一：腸炎ビブリオ O6:K18 株 LPS の糖鎖構造、第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月。
- 2) 一色恭徳、近藤誠一：腸炎ビブリオ O3:K6 株のリポ多糖（LPS）の糖鎖構造、第 52 回毒素シンポジウム、2005 年 7 月。
- 3) 近藤誠一、一色恭徳：腸炎ビブリオ O3 リポ多糖（LPS）の化学的・血清学的性状、第 39 回腸炎ビブリオシンポジウム、2005 年 10 月。
- 4) 一色恭徳、近藤誠一：腸炎ビブリオ O6 リポ多糖（LPS）の糖鎖構造とその特異的抗原構造の解析、第 39 回腸炎ビブリオシンポジウム、2005 年 10 月。

課題名：コレラ菌溶血毒の膜侵入に関する研究

分担研究者 島村 忠勝・昭和大学医学部細菌学教室

協力研究者 生貝 初・鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科

研究要旨

コレステロール結合活性を持つ *Vibrio cholerae* hemolysin(VCH)の細胞膜侵入機構について点突然変異法を用いて解析した。はじめに点突然変異法を用いて作製した7つの変異 VCH のコレステロール結合活性を調べた。コレステロール結合領域が65kDaの成熟型VCHのN末端側に存在する ECTFNNSWLWKNであることを示唆する結果を得た。また、pro領域がN末端に結合した非活性型、すなわち細胞傷害性がない pro-VCHにもコレステロール結合活性があることが分かった。したがって、pro-VCHも標的細胞に結合している可能性が示唆された。次にリン脂質/コレステロール単分子膜を用いてVCHの膜貫通能について調べた。原子間力顕微鏡によってVCHと思われる粒子像がリン脂質を多く含むマトリックス領域に多数観察されたが、コレステロールラフト領域にはまったく観察されなかった。同様に pro-VCHもマトリックス領域にのみ貫通していることが分かった。これらの結果は、標的細胞膜のコレステロールに結合した pro-VCHは、集合体形成能がないので単量体のまま膜に侵入し、細胞外にある pro領域が切断された後、集合体が形成されることを示唆している。

A. 研究目的

コレラ菌(*Vibrio cholerae*)の主たる病原性因子はコレラ毒素であるが、コレラの流行地域におけるフィールド調査でしばしばコレラ毒素を産生しない溶血性エルトールタイプの *V. cholerae* が単離されている。最新の分子疫学調査では、重症のコレラ患者から分離されたコレラ毒素遺伝子を持たないナグビブリオ(*V. cholerae* non-O1/non-O139)のほとんどにエルトール型の *hlyA* 遺伝子が検出され、その遺伝子産物であるコレラ菌溶血毒(VCH)が病原性因子として可能性があ

ることをその報告は示唆している(Proceedings of 40th anniversary United States-Japan cooperative medical science program, p. 86, N. Hirakawa *et.al.*, 2004, 日本防菌防黴学会第31回年次大会要旨集, p.70, 平川等, 2004)。しかしながら、分子レベルでのVCHの細胞傷害活性の解析は十分ではなく、VCHのどの領域がコレステロール結合活性、集合体形成活性、あるいはチャネル活性に寄与しているかは明らかにされていない。そこで、我々は大腸菌を用いて種々のVCH欠損変異体タンパク質を作製し、VCHの機

能領域の特定を行っている。本研究では、VCH の毒性発現の本体である標的細胞膜上に孔形成集合体を構築する過程を明らかにするために、膜と相互作用する初期の段階に焦点をあて、コレステロール結合後の膜侵入機構について解析を進めた。

B. 研究方法

1) *hlyA* フラグメントの作製

V. cholerae O1 N86 株のゲノム DNA を鋳型にして pro-VCH をコードする *hlyA* DNA フラグメント(約 2.2kb)を大量に作製した。

2) ベクターの作製

作製した pro-VCH-*hlyA* DNA フラグメントを、T7 プロモーターと poly His タグを持つ発現プラスミドベクター (pET-15b)に挿入した。

3) 組み換え pro-VCH の発現

pro-VCH を発現する大腸菌をアンピシリン添加 LB 培地で培養し、途中 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)で組み換え VCH の発現を誘導した。

4) 変異 *hlyA* フラグメントの調製

V. cholerae O1 N86 株のゲノム DNA と岡山県立大学の山本耕一郎教授より分与された 7 つの点突然変異 VCH((E156A, C157A, C157F, T158A, F159W, W163A, G170W)を鋳型として、enterokinase で切断できるように設計

したプライマー VCH-mature-EK-F (5'-TTT TTT GTC GAC ATG ACG ACG ACG ACA AGA ACA GCG AAA CAA ATA CCT TGC-3')とプライマー VCH-mature-R-Myc Thr(5'-TTT TTT GGA TCC TAC TCG AGG TCT TCT TCG GAA ATC AAC TTC TGT TCG CTG CCG CGC GGC ACC AGG GTA CCG TTC AAA TCA AAT TGA ACC CC-3')を組み合わせて、各点突然変異 VCH をコードする変異 *hlyA* フラグメントを PCR によって大量増幅した。変異 *hlyA* フラグメント内の配列 [GGATCC] と [GTCGAC]部分を制限酵素 *Bam*H I と *Sal*I を用いて完全に消化後、変異 *hlyA* フラグメント断片の回収を行った。

5) 変異 *hlyA* 遺伝子産物の発現

ベクター pET-15b 内の配列 [CATATG] と [CTCGAG]を制限酵素 *Nde*I と *Xho*I を用いて完全に消化したベクター DNA を調製し、変異 *hlyA* フラグメント断片と連結した。このプラスミドを発現系大腸菌 *Rosetta.DE3* 株へ導入した形質転換株(7株)をアンピシリン添加 LB 培地にそれぞれ培養し、途中 IPTG で組み換え VCH の発現を誘導した。

6) 組み換え VCH の精製

各組み換え VCH を発現した大腸菌を集菌し、超音波処理で得られた上清に TALON コバルトビーズを加え、poly His タグを持つ組み換え VCH を吸着させた。イミダゾールを含む緩衝液でコバルトビーズから組み換え pro-VCH を遊離させ

て回収した。

7) 組み換え VCH のコレステロール結合活性

96-Well Filtration Plate(ミリポア)のフィルターへ 100 mM Chol を 5 μ l (500 nmols) 添加した。次に組み換え VCH(71nmols), 抗ウサギ VCH ポリクローナル抗体, ペルオキダーゼ結合抗ヤギウサギポリクローナル抗体を順に反応させた。結合した二次抗体検出のために, *N,N'*Bis(2-hydroxy-3-sulfopropyl) toline (SAT-3)を加えた後, 2M 硫酸によって発色させ, 溶液の吸光度(450nm)を測定した。

8) 組み換え VCH の集合体形成能

リポソーム(ホスファチジルコリン:コレステロール=1:1) 溶液 (100nmols/10 μ L)に VCH(2.5 μ g/2.5 μ L)を加え, 37 $^{\circ}$ C で 1 晩放置した試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し, VCH の集合体形成能を調べた。

9) 気-液界面単分子膜の表面圧-分子占有面積等温線の解析

1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine(DMPC)とコレステロールを 70/30のモル比で最終濃度が 1 mMになるようにクロロホルムに溶解し, VCH(0~0.55 μ g/mL)を含む超純水上に展開した。室温とチャンバー内水溶液の温度を 20 $^{\circ}$ C に保持し, 30分後に単分子膜の π -A 等温線を分子当たり $3.4 \times 10^{-3} \text{ nm}^2$ の面積変化率で水平方向に圧力をかけた状

態で測定した。

10) 原子間力顕微鏡による混合脂質膜のトポロジー像の観察

VCH を含む水溶液中に展開した単分子膜に $3 \pm 0.5 \text{ mN/m}$ の表面圧をかけ, 水面降下法でシリカ基板上に単分子膜を移行した(移行率, 1mm/min)。原子間力顕微鏡 (AFM) による単分子膜像は SPA300(Seiko Instruments Inc.)を用いて画像化された。

C. 研究結果

1) 組み換え VCH の生物活性

初めに組み換え pro VCH, トリプシンを用いて組み換え pro VCH から pro 領域を切断した組み換え VCH(r-VCH), および *V. cholerae* non-O1 S7 から分離した VCH(native VCH)のコレステロール結合活性を比較した。その結果いずれの VCH タンパク質もほぼ同様のコレステロール結合活性を示した。

次に各精製 VCH について集合体形成能について調べた。pro-VCH はまったく集合体を形成しなかったが, native VCH と r-VCH は SDS ゲル上で泳動距離がほぼ同じところに染色バンドが出現し, 発色も同程度であることから, 組み換えによる集合体形成能の低下はないと考えられた。一方, pro-VCH は集合体形成能がなかった。また, 孔活性を調べるためにウサギ赤血球 (1mL) に対する VCH(125ng)の溶血能を調べた。native VCH と r-VCH はともにほぼ同じ溶血活性を示したが, pro-VCH は溶血活性を示

さなかつた。

これらの結果から、組み換え pro-VCH と r-VCH の生物活性は native VCH とほとんど変わらないことが示唆されたので、後述する単分子膜を用いた膜侵入実験に組み換え VCH を用いた。

2) コレステロール結合領域の同定

本実験では pro-VCH の pro 領域の後に EK 切断部位が挿入された pro-VCH を用いた。EK 切断部位が挿入されていない pro-VCH とコレステロール結合活性を比較したがほぼ同じ値を示した。

7つの点突然変異 VCH(E156A, C157A, C157F, T158A, F159W, W163A, G170W)を作製した。pro-VCH のアミノ酸配列中には、グラム陽性菌から産生されるコレステロール結合活性を持つ孔形成毒素の Pneumolysin, Streptolysin O, Perfringolysin O, Listeriolysin O のコレステロール結合領域のアミノ酸配列(ECTGLAWEW WR) と約 50% の similarity を持つ配列(156ECTFNNSW LWKN167)が存在する。native VCH では、N末端側 13 から 24 の位置に相当する。

各変異 VCH のコレステロール結合活性を測定すると、N末端側に近い連続したアミノ酸領域(ECTF)を置換することによってコレステロール結合活性が減少した(図 1)。

一方、C末端側の 163 番目のトリプトファンや予想している結合領域から外れたグリシンの置換ではこの活性に変化はみられなかつた。この結果は VCH のコレステロール結

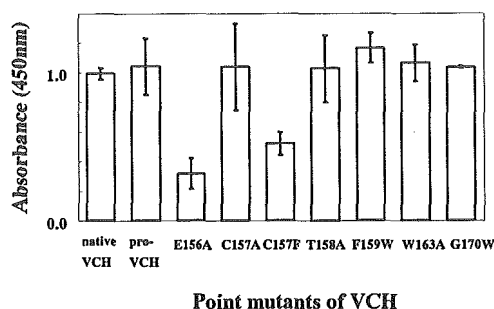


図 1. 点突然変異 VCH のコレステロール結合活性

合領域が、ECTGLAWEWWR である可能性を示唆している。

この置換したアミノ酸の中で、E156A と C157F の変異 VCH の活性の減少がもっとも大きく、有意差もみられた。グリシンからアラニンへの置換の場合、側鎖が H から CH₃ に変化するため疎水性が増大する。また、システインからフェニルアラニンへの置換は極性アミノ酸から疎水性アミノ酸への変異である。

アミノ酸配列 ECTGLAWEWWR と ECTFNNSWLWKN の疎水度を調べると、いずれも親水性の方へ傾いている。したがって、この領域がコレステロールと結合する場合、コレステロールの疎水性部分へ結合するよりも膜表面に出ているところかあるいは表面近くに位置する部分へ VCH が結合すると考える方が理にかなっているかもしれない。VCH はコレステロールの A 環 3 位に存在する OH と B 環の 5 位と 6 位の間にある 2 重結合を認識することを我々は既に明らかにしている。また、VCH はトランス型に配位している OH を持つコレステロー

ルにのみ結合し、シス型の OH を持つコレステロールにはまったく結合しない。したがって、極性アミノ酸である 156 番目のグリシンや 157 番目のシステインを疎水性アミノ酸に置換するとコレステロール結合活性が低下するのは、膜表面近傍に位置するコレステロール A 環 3 位の OH を中心とした部位との相互作用が減少するためと考えたと合理的な説明ができる。また、C157A の置換による結合活性の減少がみられないのは、システインとフェニルアラニンの疎水度はほぼ同じで、これらに比べてアラニンの疎水度は低い。アラニンの側鎖である CH₃ よりもフェニルアラニンの側鎖であるフェニル基の方が構造が大きく、結合時の立体障害が出やすくなるのがコレステロール結合活性減少の原因になるのかもしれない。いずれにしても 1 アミノ酸残基の置換では大幅なコレステロール結合活性の変化はみられないと考えられる。

3) VCH と単分子膜の相互作用

native VCH を超純水中に添加し DMPC/コレステロール単分子膜を表面に形成後、単分子膜の表面圧-分子占有面積等温線を分析した。単分子膜の π -A 等温線は native VCH を添加しない時に比べて VCH を 0.28, 0.55 μ g/mL と増やしていくと右側にシフトし、表面積が大きくなっていくことが分かった(図 2)。これは VCH が単分子膜と相互作用があることを示している。さらに超純水への VCH の添加量が 0.86 μ g/mL になると、シフトする値が鈍化してくるので、単分

子膜と相互作用する VCH の濃度が飽和してきたのではないかと考えられた。

4) AFM による単分子膜の観察

表面圧-分子占有面積等温線分析によって native VCH と単分子膜の相互作用が明らかとなった。そこでさらにこの相互作用が何であるのかを確かめるために、AFM を用いて単分子膜表面を観察した。

native VCH を添加した超純水の表面に単分子膜を展開し、水に接している面をマイカ基板へ吸着させた後、大気に接している面(疎水性部分)を AFM で観察した。その結果、VCH と思われる粒子像がコレステロールラフト^{注1}(図 3A-D)に存在せず、DMPC を多く含むマトリックス領域^{注2}(図 3A-M)にのみ膜を貫通して疎水面へ突き出ていることが分かった。これは膜面に対して垂直方向に VCH が侵入する場合、リン脂質を多く含む膜が必要であることを示している。また、pro-VCH を超純水に浮遊させた時も、単分子膜のマトリックス領域にのみ pro-VCH が貫通していることが分かった(図 3B)。

注1 コレステロールに富んでいるが DMPC も含んでいる。

注2 DMPC に富んでいるがコレステロールも含んでいる。

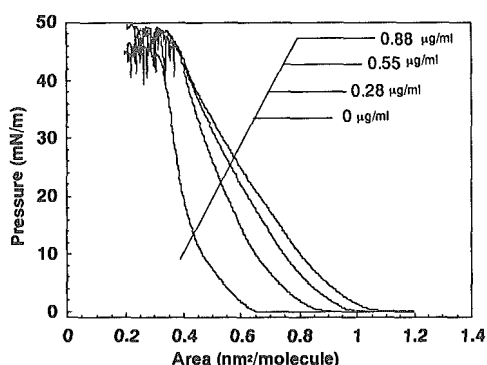


図 2. DMPC/コレステロール単分子膜の表面圧-分子占有面積等温線測定は 20°C で行った。

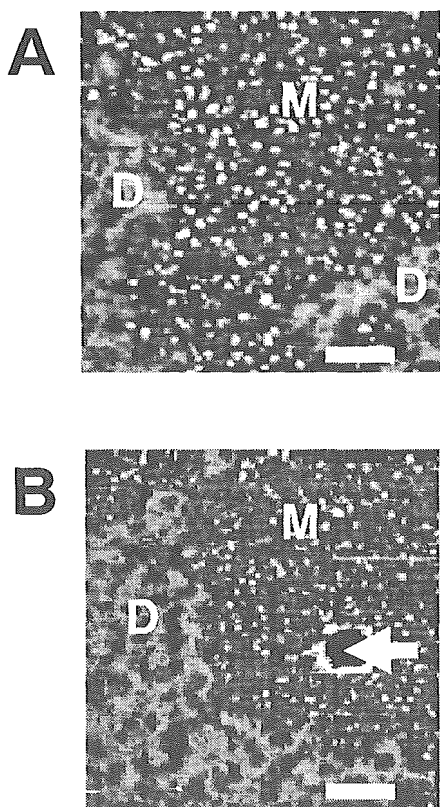


図 3. 単分子膜を貫通した VCH
A, native VCH ; B, pro-VCH ; M, マトリックス領域 ; D, コレステロールラフト ; 白矢印, 膜の剥離箇所 ; 白バー, 200nm.

C. 考察

VCH のコレステロール結合領域が ECTFNNSWLWKN であることを示す実験結果を得た。この領域は 65kDa の成熟型 VCH では N 末端側 13 から 24 の間に存在することが分かった。また, pro-VCH は 156 から 167 の間にあり, native VCH と同様のコレステロール結合活性があることは pro 領域の働きが標的細胞膜との結合を阻害するものではないことを示している。さらに興味深い結果として, native VCH および pro-VCH はともに単分子膜を貫通したが, リン脂質を多く含むマトリックス領域のみであった。今後, リン脂質とコレステロールの混合比を変えた単分子膜を作り VCH の膜貫通について実験することを予定している。また, 図 3 の結果は疎水性側から見た VCH の膜侵入像であるが, 将来的には親水性側から VCH と膜の相互作用について検討していく予定である。さらに pro-VCH の膜侵入能は, VCH の孔状集合体形成機構に 1 つの手がかりを与えた。すなわち, pro-VCH がコレステロールに結合した後, 膜侵入, pro 領域の切断, 集合体形成, 孔形成という連続したプロセスがあることを示唆している。

D. 結論

VCH のコレステロール結合領域が ECTFNNSWLWKN である可能性が示唆された。また, この結合領域を持っている pro-VCH もコレステロール結合活性を示した。さらに単分子膜を用いて native VCH と膜の相互作用を AFM で

観察したところ、VCH 様粒子がマトリックス領域に多数観察された。一方、これらの粒子はコレステロールラフト領域に観察されなかった。pro-VCH 様粒子もマトリックス領域に多数観察され、コレステロールラフト領域には観察されなかった。native VCH と pro-VCH は水溶性タンパク質であることならびに集合体を形成しない pro-VCH が単分子膜を貫通することから、コレステロール結合後 VCH 単量体の構造変化が起き、疎水性の膜侵入ドメインが現れるのではないかと考えられた。

F. 研究発表

学会

(1) 舟橋伸昭, 服部圭一, 林 将大, 中山浩伸, 生貝 初, 千田美紀, 千田俊哉, 山本耕一郎, 島村忠勝: コレラ菌溶血毒の毒性発現に關与する領域の同定, 第 78 回日本細菌学会, 平成 17 年 4 月, 東京.

赤痢菌 (*Shigella* spp.) の薬剤耐性化機構の解析

島本 整

広島大学大学院生物圏科学研究科

研究要旨

広島県内で患者より単離された 26 株の赤痢菌 (*Shigella* spp.) の薬剤耐性パターンと耐性化機構の解析を行った。薬剤耐性遺伝子の転移に関与する転移性遺伝因子であるインテグロンの解析を行ったところ、クラス1インテグロンが *S. sonnei* の1株のみで見つかった。塩基配列解析の結果、このインテグロンは、streptothricin acetyltransferase 遺伝子 (*sat*) と aminoglycoside adenyltransferase 遺伝子 (*aadA2*) を含んでいることが明らかになった。また、クラス2インテグロンは、調べた赤痢菌に広く分布しており、15株の *S. sonnei* と5株の *S. flexneri* が保有していることがわかった。内部の遺伝子構成から検出されたクラス2インテグロンは、2つのタイプに分類された。さらに、近年大きな問題となっている基質拡張型 β -lactamase 遺伝子についても調べたところ、8株中7株の *S. flexneri* が *bla*_{0XA-30} 遺伝子を保有していることがわかった。

A. 研究目的

赤痢菌 (*Shigella* spp.) は、2類感染症である細菌性赤痢の原因菌である。4菌種 (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*) の赤痢菌の中で日本国内では *S. sonnei* が最も多く単離されている。赤痢菌には多剤耐性株が多く、抗菌薬による治

療の妨げとなっている。

インテグロンは、薬剤耐性遺伝子の伝播に関与する可動性遺伝因子の一種である (図1)。インテグラーゼ遺伝子 (*intI*) を含む 5'-conserved segment と 3'-conserved segment に挟まれた部分に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子カセットが挿入され、上流側に存在するプロモーターより薬剤耐性遺伝子が発現する。インテグロンは、インテグラーゼの配列の違いなどによってクラス1からクラス4に分類されており、その中で薬剤耐性に関与しているのは、クラス1-3である。

また、近年、広範囲の β -ラクタム

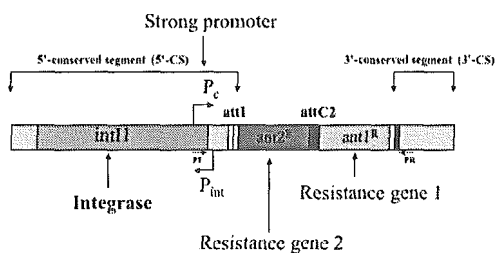


図1 インテグロンの基本構造

剤に耐性を示す基質拡張型β-ラクタマーゼ（extended-spectrum β-lactamase, ESBL）が大きな問題となっている。ESBLは、オキシミノセファロスポリンやアズトレオナムを分解するβ-ラクタマーゼである。

本研究では、近年広島県内で単離された赤痢菌の薬剤耐性状況と薬剤耐性化機構を遺伝子レベルで明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1) 供試菌株

2000年から2004年にかけて広島県内で患者より単離された26株の赤痢菌（*Shigella* spp.）臨床分離株を用いた。内訳は、*S. sonnei*が17株、*S. flexneri*が8株、*S. boydii*が1株である。

2) 薬剤耐性遺伝子の検出と同定

表1に示したプライマーを用いてPCR法によってクラス1、クラス2インテグロン、ESBLの検出を行った。インテグロンが検出された場合は、内部の耐性遺伝子を同定するために、PCR断片の塩基配列を決定した。

表1 本研究で用いたプライマーの塩基配列

Name	Sequences (5 to 3 ends)	Target Size
Integrons		
Int1-5CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variable
Int1-3CS	AAGCAGACTGACCTGA	
Int2-5CS	GATGCCATGGCAAGTACGAG	Variable
Int2-3CS	CGGGATCCCGGAGGCCATGCAAGATTTGTA	
Int2-F2	GATCCCTGCCATCATIGAGTA	Within class 2 Integron
Int2-R2	AGGGGAAGCCGAAGTTTCC	
ESBLs		
CTX-M-F	CGCTTTGGGATGTGGCAG	550-bp
CTX-M-R	ACGGCGATATCGTTGGT	
TEM-F	ATAAAATFCTTGAAGACGAAA	1,060-bp
TEM-R	GACAGTTACCAATGCTTAATC	
SHV-F	TTATCTCCCGTGTAGCCACC	795-bp
SHV-R	GATTTGCTGATTTCCGCTGGG	
CMV-F	GACAGGCTCTTCTCCACA	1,000-bp
CMV-R	TGGAAAGGAAAGGCTACGTA	
OXA-F	TCAACTTCAAGATGGCA	591bp
OXA-R	GTGCTTTAGAAATGGTGA	
OXA-F-2	ATTAAGCCCTTACGAAACCA	890-bp
OXA-R-2	AAGGGTTGGGCGATTTGGCCA	

3) サザンハイブリダイゼーション

ESBL 遺伝子の一種、*bla*_{OXA-30} 遺伝子が *S. flexneri* ゲノムのどこに存在しているのかを明らかにするために、*S. flexneri* の染色体 DNA を含むプラスミド分画をアガロースゲル電気泳動によって分離し、*bla*_{OXA-30} 遺伝子の PCR 断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

4) パルスフィールドゲル電気泳動

本研究で用いた26株の赤痢菌の類縁関係を明らかにするためにパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）によってゲノム DNA の解析を行った。

C. 研究結果

1) 試験菌株の薬剤耐性

用いた26株の赤痢菌の薬剤耐性をディスク法で調べたところ、23株が何らかの抗生物質に対して耐性を示した。

2) クラス1インテグロンの解析

PCRによってクラス1インテグロンの有無を調べたところ、26株中1株（*S. sonnei* Sh02002株）のみが保有していることが明らかになった。増幅されたPCR断片の塩基配列を決定したところ、このインテグロンは、ストレプトスリシン耐性遺伝子（*sat1*）とアミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ

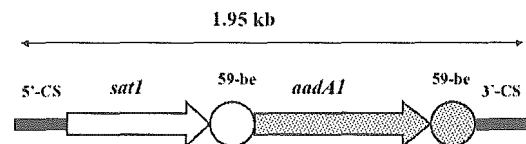
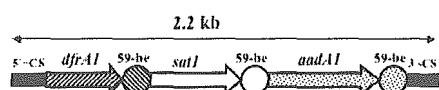


図2 *S. sonnei* で検出されたクラス1インテグロンの遺伝子構成

A Typical class 2 integron



B Unusual class 2 integron detected in *S. sonnei*

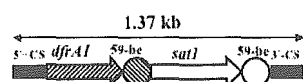


図3 *S. sonnei*と*S. flexneri*で検出された典型的なクラス2インテグロンの遺伝子構成(A)と*S. sonnei*で見つかった例外的なクラス2インテグロンの遺伝子構成(B)遺伝子(*aadA2*)を含んでいることがわかった(図2)。

3) クラス2インテグロンの解析

PCRによってクラス2インテグロンの有無を調べたところ、*S. sonnei*では17株中15株、*S. flexneri*では8株中5株で検出された。1株のみの*S. boydii*はクラス2インテグロンを保有していなかった。塩基配列の解析結果より、クラス2インテグロンを保有している20株の19株は、従来型のクラス2インテグロンの典型的な遺伝子構成であるジヒドロ葉酸還元酵素(トリメトプリム耐性)遺伝子(*dfrA1*)、ストレプトスリシン耐性遺伝子(*satI*)、アミノグリコシドアニルトランスフェラーゼ遺伝子(*aadA2*)を含んでいた。また、1株の*S. sonnei*(Sh04005株)は、典型的なクラス2インテグロンとは異なり、2つの耐性遺伝子カセットのみを含んでいた。含まれていた遺伝子は、*dfrA1*と*satI*であった。

4) 基質拡張型 β -ラクタマーゼ

(ESBL) 遺伝子の解析

PCRを利用してESBL遺伝子の有無を調べた。本研究では、CTX-M、TEM、SHV、CMY、OXAについて調べた。その結果、調べた26株中7株でOXA遺伝子が検出された。また、検出された7株はすべて*S. flexneri*であり、8株の*S. flexneri*でOXAを持っていなかったのは1株のみであった。一方、OXA以外のESBL遺伝子については、いずれも検出されなかった。検出されたOXA遺伝子のタイプを明らかにするために、OXA-F-2とOXA-R-2のプライマー(表1)を用いてOXA遺伝子の全領域の増幅を行い、PCR増幅断片の塩基配列を決定した。その結果、7株すべてにおいて検出されたOXA遺伝子は、OXA-30であることがわかった。

5) サザンハイブリダイゼーションによる bla_{OXA-30} 遺伝子の同定

*S. flexneri*で検出された bla_{OXA-30} 遺伝子のゲノム中での存在場所を明らかにするためにPCR断片をプローブとするサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、 bla_{OXA-30} 遺伝子は、*S. flexneri*の染色体DNAに存在していることが明らかになった。

6) パルスフィールドゲル電気泳動による各菌株のゲノム解析

今回用いた26株の赤痢菌の類縁関係を調べるためにパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)によって各菌株のゲノムの比較を行った(データは省略)。その結果、同じ耐性遺伝子を持っている株は、PFGEのバンドパターンが類似していたが、異なる耐性遺伝子