

Table 2. Oligonucleotide primers and PCR conditions for amplification of colicin genes

Target	Primer(5'----3')	Condition	Products
Colicin B	AAGAAAATGACGAGAAGACG GAAAGACCAAAGCTATAAGG	94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 1min 35 cycles	493bp
Colicin E1	TTTGAATGCTACTCCTGACGG GTTCCAGCAAG CAAGCTAAA	94°C 30sec, 55°C30sec, 72°C 102sec 35 cycles	1398bp
Colicin E7	ATGAGCGGTGGCGATGGACGC ACCTCGGTGAATATCAATATGTCCG	94°C 30sec, 55°C30sec, 72°C 102sec 35 cycles	1705bp
E2/E3/E6/E7	ATGAGCGGTGGCGATGGACGC GCCCGGCCAATTTGCCACATTTCT	94°C 30sec, 55°C30sec, 72°C 102sec 35 cycles	1160bp
Colicin Ia/Ib	ACGTATTACAAATCCCGGTGC CTTTTCCTTCAACAGGGCA	94°C 30sec, 55°C30sec, 72°C 102sec 35 cycles	1250bp
Colicin K	GGTGATGTGAATAAACAGAAGG CAGCGTGACAAACAAGG	94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 1min 35 cycles	792bp
Colicin M	CATCACCATCAACTAACTTACC CTCTTTACCAGAAAACATCG	94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 1min 35 cycles	737bp
Colicin V	CACACACAAACGGGAGCTGTT CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 1min 35 cycles	680bp

Table 3. *Distribution of E. coli O157 inhibitors in each age group of healthy persons*

Age	No. of subjects possessing O157 inhibitor / no. of examined (%)		
	Male	Female	Total
0-6	2/15 (13.3)	1/20 (5.0)	3/35 (8.6)
20-29	5/22 (22.7)	9/63 (14.3)	14/85 (16.5)
30-39	6/40 (15.0)	6/42 (14.3)	12/82 (14.6)
40-49	5/22 (22.7)	3/25 (12.0)	8/47 (17.0)
50-59	8/29 (27.6)	7/25 (28.0)	15/54 (27.8)
All	26/128 (20.3)	26/175 (14.9)	52/303 (17.2)

Table 4. *Distribution of colicin types of E. coli O157 inhibitors in healthy persons*

Source	No. of subjects possessing O157 inhibitors	No. of O157 inhibitors producing		
		Group A	Group B	Not identified
Healthy persons	52	7	5	16
Asymptomatic carriers	9	5	1	3
Total	61	12	6	19

Table 5. Sensitivity of *E. coli* O157 strains to colicinogenic standard strains

O157 strains examined	Inhibition by standard strains producing colicin											
	E2	E3	E5	E6	E7	E8	E9	Ia	Ib	D	B	
96-98-83	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
020513	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
020517	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
020602	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
020806	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
020827	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
020827	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
020912	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
020920	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
021010	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
030512	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	
030001	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
030002	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
030003	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
030723	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
031117	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
040524	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
040611	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
040831	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
040930	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
041019	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
041012a	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
040112b	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	



Fig. 1 Inhibition of *E. coli* 0157 in agar overlay by colicinogenic bacteria

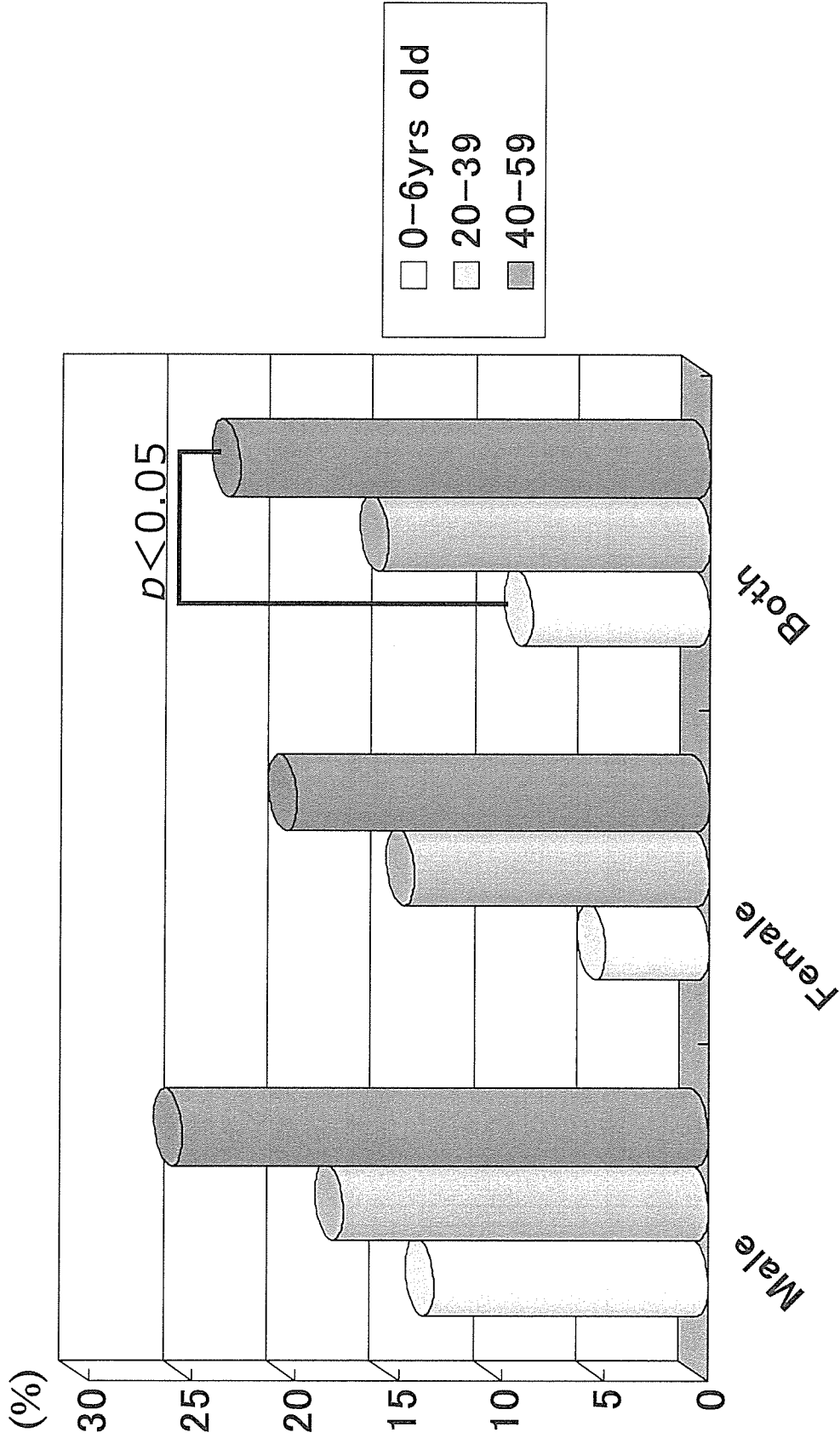


Fig. 2. Isolation rates of *E. coli* O157 inhibitors in each group classified on the basis of age and sex.

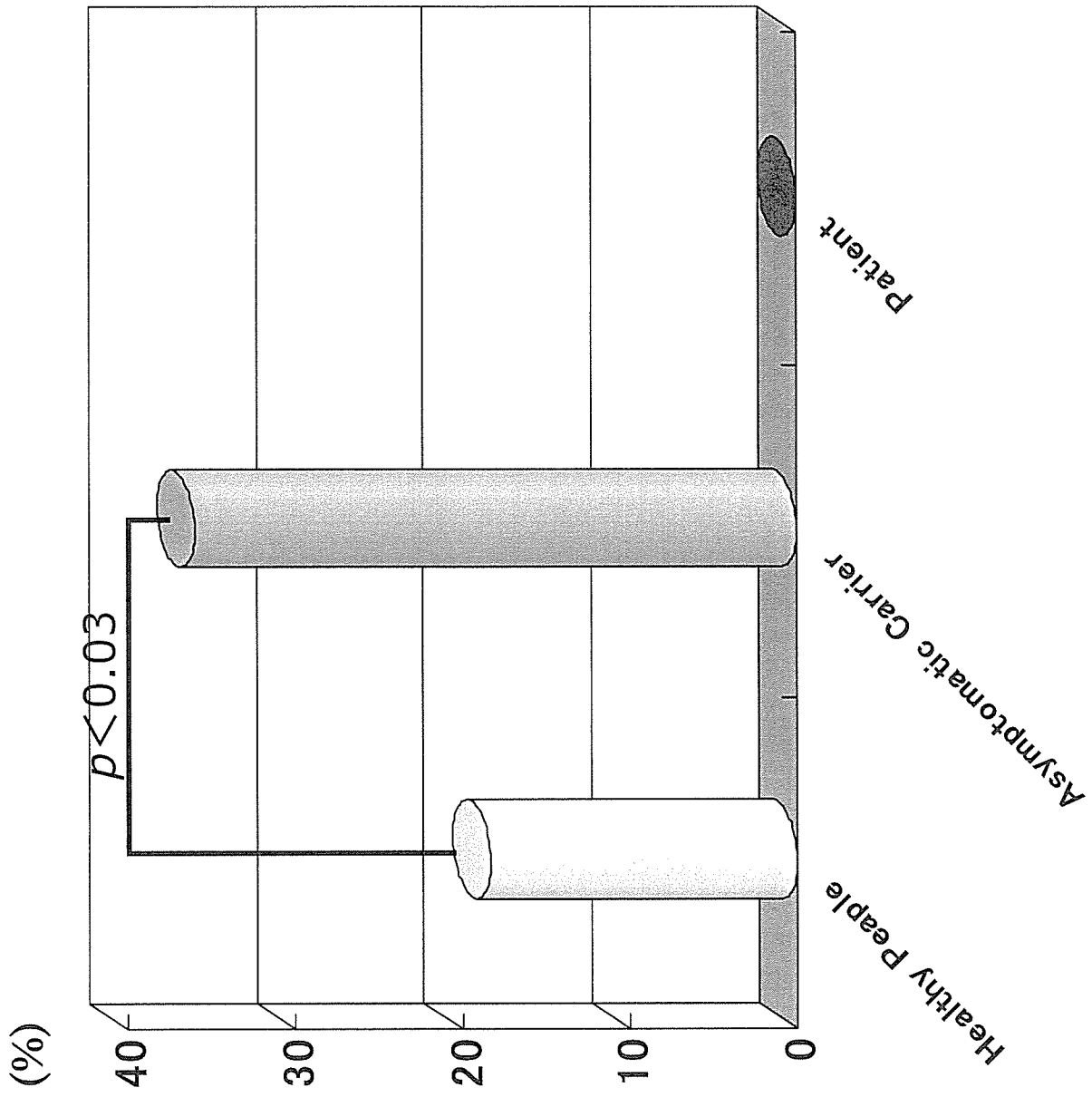


Fig. 3. Comparison of Isolation rates of *E. coli* O157 inhibitors between healthy adults and asymptomatic carriers.

課題名：コレラ菌溶血毒の膜侵入機構

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

コレラ菌溶血毒(VCH)が単分子膜に侵入する過程について原子間力顕微鏡(AFM)を用いて解析した。Dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC)-cholesterol 単分子膜の表面圧を 3 mN/m に保持しながら水相に VCH を添加すると、VCH の膜挿入による結果と思われる単分子膜の膨張ならびに DMPC と cholesterol の両成分が含まれるマトリックス領域中に直径約 10nm のドットが観察された。3mN/m 以上の表面圧を膜に掛けていくと、単位面積あたりのドット数が減少していく傾向がみられ、14mN/m に達すると観察されなくなった。ドットの消失は表面圧の増加によって膜の分子密度が高まり、VCH の膜侵入が阻害されたためではないかと考えられた。Cholesterol 単分子膜に VCH を作用させると、膜面積は単調に増加し 12 時間後に一定となった。この結果は、cholesterol のみでも VCH が膜に作用することを示している。また、非溶血性古典型コレラ菌(569B 株)が、カルボキシル末端が欠損した VCH を発現しているかどうか検討した。この解析のために、古典型コレラ菌の *hlyA* 配列から発現が予想しえるポリペプチド配列をもとに 29kDa のトランケート型 VCH(rP29)を遺伝子組み換えにより作製し、さらに rP29 をウサギに免疫して抗 rP29 IgG を得た。抗 rP29 IgG と反応する成分が 569B 株菌体中にあることが明らかとなり、cell lysate から分子量約 90kDa のタンパク質を分離することができた。このタンパク質を SDS 存在下 95°C で加熱し SDS-PAGE を行うと、約 50kDa のタンパク質に分子量が減少したので、サブユニット構造を形成している可能性が考えられた。

### A. 研究目的

コレラ菌(*Vibrio cholerae*)の産生するコレラ菌溶血毒(pro-VCH)の X 線結晶構造解析は 2005 年に Olson と Gouaux によって行われ、いくつかの興味深い知見が得られた(1)。特筆すべき成果は、VCH は黄色ブドウ球菌  $\alpha$  毒素やロイコシジンとの間に構造ホモロジーがあり、全体の立体構造が酷似しているだけでなく、

膜を貫通するドメインもほぼ同一の構造を持っていることが明らかになったことである。したがって、膜中で形成される集合体のサブユニット数がいずれも 7 つであるということも構造的に必然性を持っていると考えられる。一方、VCH だけが持つ特徴として、細胞表面に存在する糖(2, 3)やコレステロールとの結合活性がある(4)。X 線結晶構造解析

によって2つのレクチン結合ドメインが同定されたが、コレステロールと親和性を持つ部位は明らかにされなかった。しかしながら、VCH とコレステロールの間には結合や集合体形成に関与した相互作用があることは紛れもない事実である(4)。これについては Olson と Gouaux も再三に亘って彼らの論文の中で言及している(1)。また、VCH の結晶構造解析によって VCH の膜侵入機構が明らかにされたわけではなく、むしろ膜侵入機構を明らかにするためにどのように解析を進めていけばよいかその方向性を示しているものといえる。

我々は、通常 of 微細構造を観察する手段では得ることが不可能な 3次元情報について原子間力顕微鏡(AFM)を用いることによって獲得し、VCH の膜侵入機構を明らかにしたいと考えている。本年度は、膜に横方向から圧力を掛けることによって VCH の膜侵入が影響を受けることならびに VCH がコレステロール単分子膜に侵入することを明らかにしたので報告する。また、VCH の構造遺伝子(*hlyA*)を持つ古典型コレラ菌が非溶血性である理由は、構造遺伝子中の 11 塩基対の欠失とその後ろに stop コドンが挿入され、VCH がカルボキシル末端欠損体になるためと考えられているが(5)、この欠損体が発現されているかどうかは未だに不明である。今回、我々は古典型コレラ菌 569B 株から VCH 様タンパク質が産生されていることを見出したので報告する。

## 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 フラグメントと *V. cholerae* O1 569B 株のゲノム DNA を鋳型にして配列の途中で stop コドンが挿入されている部分までをコードする pro 領域を含む DNA フラグメント(*hlyA-pro29*)をそれぞれ 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。

### 2) 組み換え pro-VCH の発現と精製

*hlyA* と *hlyA-pro29* の遺伝子産物である pro-VCH と rp29 を発現する大腸菌をそれぞれアンピシリン添加 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。次に各組み換え 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

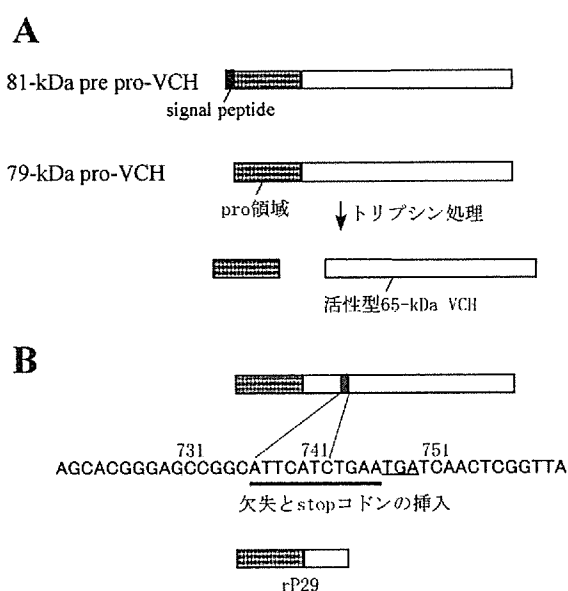


図1. 組み換え VCH

A はコレラ菌から産生されている VCH。B は古典型コレラ菌の *hlyA* 中の欠失と stop コドンの挿入されているところ示した。



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 VCH を遊離させて回収した。

また、65kDa の活性型 VCH は pro-VCH をトリプシン(最終濃度 2.0 $\mu$ g/mL)で 30 分間、30°C で処理し、直ちに phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を添加して反応を停止させた。活性型 VCH は 250mM glucose を含む 50mM Tris-HCl /1mM EDTA/ 3mM NaN<sub>3</sub> (TEN、pH8.0)で平衡化した Sephadex-G100 superfine で分離した。図 1 に組み換え pro-VCH と rP29 の 1 次構造の概略を模式的に示した。

### 3) 組み換え VCH に対する抗体の作製

*V. cholerae* O1 N86 の培養上清から活性型 65kDa の VCH を得る際に大量に形成される spontaneous VCH 集合体をウサギに免疫し、ポリクローナル抗 VCH 抗体(抗 OL-VCH IgG)を作製した(6)。この抗体は膜上で形成された集合体だけでなく、成熟型 65kDa VCH と pro-VCH を認識する。一方、rp29 は抗 OL-VCH IgG によって認識されないので、rp29 をウサギに免疫してポリクローナル抗 rp29 IgG 抗体(抗 rp29 IgG)を作製した。

### 4) 単分子膜の調製

1,2-dimyristoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine(DMPC)と cholesterol をモル比 70:30 で混合しクロロホルムで溶解した 1mM の脂質溶液を調製し、LB 膜作製装置の水槽に満たした超純水上に展開

した。単分子膜調製装置(USI 製、FSD-300)を用いて圧縮速度 3.4 $\times 10^{-3}$ nm<sup>2</sup>/molecule $\cdot$ sec (バリエー速度 0.066 mm/sec)で 3mN/m まで膜面に対し横方向に圧縮して混合単分子膜を作製した(7)。その後、65kDa の活性型 VCH を最終濃度 0.55 $\mu$ g/ml になるように超純水中に添加した。Cholesterol 単分子膜(展開溶液濃度: 1mM)も混合単分子膜と同様の方法で作製した。

### 5) マイカ基板上への単分子膜の累積

あらかじめ劈開したマイカ基板を LB 膜作製装置の水槽に満たした超純水中に水平に沈めた後、超純水表面に単分子膜を形成させ、さらに VCH 溶液を超純水中に添加した。12 時間放置し、累積速度 1 mm/min で垂直引き上げ法により単分子膜をマイカ基板に移し取り、1 日乾燥させ AFM 観察用試料とした(7)。

### 6) AFM による単分子膜の観察

室温 20°C、湿度 40%の条件下で AFM SPI300 制御ステーションで制御しながら、constant force mode を用いて混合単分子膜を観察した。必要に応じて flat、contrast、auto 処理を行った。膜厚は以下に述べるように人為的な穴をあけることによって測定した(7)。カンチレバーを用いて膜へ強い斥力かけて数回走査し膜表面から基板までの高さの孔をあけ、この膜孔の高さをカンチレバー走査によって測定し膜厚とした。膜の穴あけは、25nN の力を単分子膜に対して掛け、Scan area(1 $\times$ 1nm<sup>2</sup>)で同じ領域を 3 回走査す

ることによって行った。

## 7) LB 曲線測定

調製した DMPC-cholesterol クロロホルム溶液(23 $\mu$ L)あるいは cholesterol クロロホルム溶液(23 $\mu$ L)を水相温度 20°C の条件下で展開時の分子占有面積が 1.2nm<sup>2</sup>/molecule になるように超純水上に展開し 30 分放置した。その後、圧縮速度 3.4 $\times$  10<sup>-3</sup>nm<sup>2</sup>/molecule $\cdot$ sec (バリアー速度 0.066mm/sec)で 3mN/m まで表面圧を掛けて圧縮した単分子膜の表面積の経時的変化量を測定した(7)。

## 8) 569B 株の培養

569B 株を 100mL のシンケース培地で 2 日間、30°C で静置培養後、遠心(12,000 rpm、15 分、4°C)によって上清と菌体に分離した。上清は最終濃度が 5mM になるように 250mM の PMSF を加えた後、0.22 $\mu$ m の滅菌フィルターでろ過した。菌体は、1mL の培養液のペレットに対しリゾチーム(1mg)と PMSF(最終濃度:5mM)を含む 100 $\mu$ L の TEN で懸濁し、室温で 30 分放置後、SDS (最終濃度:2%) でさらに可溶化し、室温で 2 日間放置した。この可溶化液を 15,000rpm で 15 分遠心し、その上清を cell lysate とした。なお、培養上清ならびに cell lysate 100 $\mu$ L を普通寒天培地にそれぞれ塗抹したが、コレラ菌は増殖しなかった。

## C. 結果および考察

### 1) DMPC-cholesterol 混合単分子膜に対

### する VCH の作用

DMPC-cholesterol 混合単分子膜に 3mN/m の表面圧を掛けながら VCH を作用させた時、混合単分子膜はマイクロメーターオーダーのドメインとマトリックス領域を持つ海島構造を形成した。ドメインを拡大した像中には蜂の巣上の空隙が有り、膜自体の流動性が低下していると思われた。一方、マトリックス中には直径が 10nm 程度のドットが多数存在していることが分かった(図 2)。ドットは、VCH を反応させた単分子膜にのみ観察されたので、VCH 粒子と考えられた。この結果は VCH が膜の親水基側から疎水基側へ貫通していることを示唆している。なお、膜のマトリックス相は蛍光顕微鏡の観察から cholesterol アンリッチ相(DMPC に富んでいるがコレステロールも含んでいる)であることが分かった。一方、ドメイン部分は cholesterol リッチ相(コレステロールに富んでいるが DMPC も含んでいるラフト領域)である。

VCH と考えられるドットはマトリックス領域中にのみ出現していることが特徴としてあげられる。VCH がリポソーム膜に作用するためには cholesterol が不可欠とされている。単分子膜中の cholesterol 量の多いドメインに VCH と考えられるドットが観察されていないことは興味深い結果といえる。

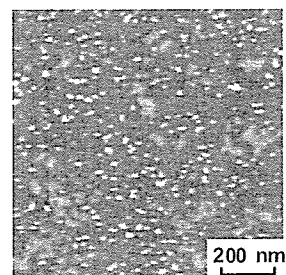


図 2. 表面圧 3mN/m の混合単分子膜 (DMPC/cholesterol)へ VCH を 12 時間反応させた AFM 像

次に、表面圧を 6、9、14、20mN/m に増加させた 4 つの混合単分子膜を作製し、各単分子膜に対し VCH を 12 時間反応させた後、AFM で観察した(図 3)。6mN/m あるいは 9mN/m の表面圧を掛けた単分子膜は、マトリックス部分が激減していることが分かった。最終的に 14mN/m の表面圧を掛けた単分子膜ではマトリックス領域がなくなり、ドットの発現もみられなくなった。これらの結果は、VCH は DMPC-cholesterol 混合単分子膜上のマトリックス領域を標的にしていることを示している。しかしながら、3、6、9mN/m の表面圧を掛けた各単分子膜中のマトリックスに存在するドット数は表面圧が異なるにも関わらず、ほぼ一定の数であることが分かった。VCH の膜侵入の効率性は膜を構成する脂質分子の密度が 1 つの支配因子となっている。したがって、3、6、9mN/m の表面圧を掛けられた単分子膜のマトリ

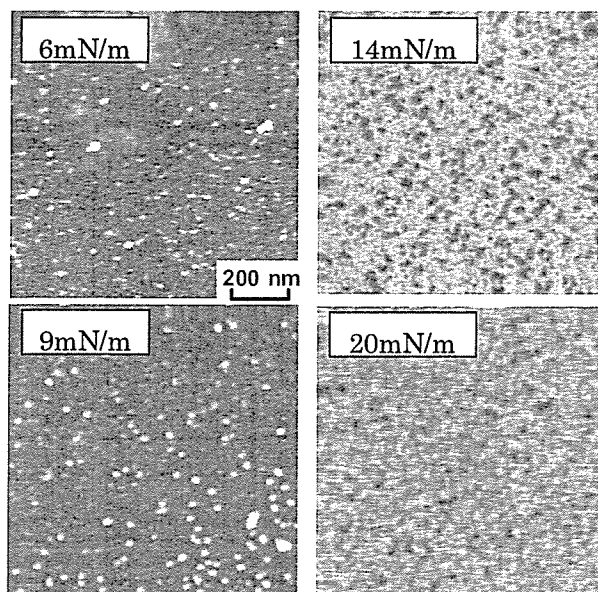


図 3. 異なる表面圧を掛けて形成させた混合単分子膜(DMPC/cholesterol)へ VCH を 12 時間反応させた AFM 像

ックス領域の脂質分子密度に差がないことが考えられた。

## 2) Cholesterol 単分子膜に対する VCH の作用

VCH 単量体は混合単分子膜のマトリックス領域にのみ作用したが、DMPC に作用しているのかあるいは cholesterol に作用しているのか明らかにできなかった。そこで、cholesterol 単分子膜に VCH が侵入するかかどうか調べた。

図 4 は、超純水および VCH 水溶液 (0.55  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 上に形成された cholesterol 単分子膜の面積歪みの経時変化を示した。超純水上では、cholesterol 単分子膜は圧縮直後から膜面積が減少し、約 1 時間後に面積歪み 0.26 で一定となった。一方、VCH を注入した場合は、膜面積は単調に増加し、12 時間後には面積歪みが -0.16 で一定となった。この結果は、VCH はコレステロール単分子膜に結合していることを示している。

さらに、VCH 水溶液(0.55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )上に cholesterol 単分子膜を形成させ 12 時間放置後、AFM を用いて膜を観察した。局所的に円形のドメインが形成されて

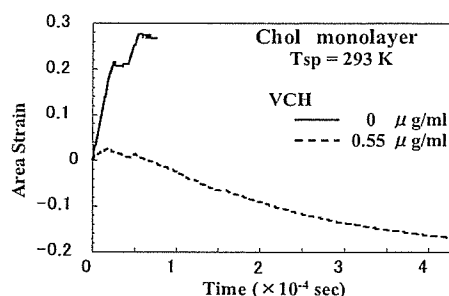


図 4. 純水上及び VCH を含む水溶液上での cholesterol 単分子膜の面積歪みの経時変化。

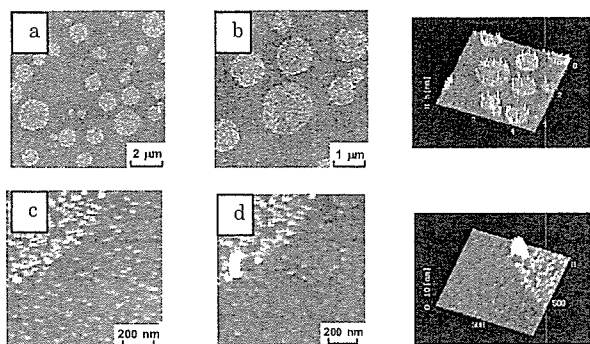


図5. VCHのCholesterol単分子膜への侵入  
 a:  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ , b:  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , c:  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , d:  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$   
 の範囲で穴あけ操作を行った。この結果は、上図右の  
 2枚の画像に示した。

いることがわかった(図 5a-b)。走査範囲  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  の視野で膜にドットが点在し、特に円形のドメインの中に多数のドットが存在していることが確認できた(図 5c)。また、単分子膜に穴をあけて膜厚を測定した結果、円形ドメイン中に存在しているドットは、円形ドメインの外側に存在しているドットよりも高く突き抜けていることが分かった。これらの結果から、VCHがDMPC-cholesterol混合単分子膜のマトリックス領域に作用するように、cholesterol単分子膜においても作用しやすい領域が存在することが明らかとなった。しかしながら、VCHはDMPC-cholesterol混合単分子膜のcholesterolがリッチなドメイン構造を貫通しないにもかかわらず、何故cholesterol単分子膜を貫通するのかという問題が未解明のまま残された。おそらく両者の膜構造に起因すると考えられるので、今後詳細な単分子膜構造の研究を予定している。

### 3) 569B株のVCH様タンパク質の発現

我々は、古典型コレラ菌の *hlyA* 配列

から発現の可能性が考えられる pro 領域を含む rP29 を大腸菌によって発現させることができたので、古典型コレラ菌においても rP29 と同様の VCH が発現している可能性があると考えた。そこで、カルボキシル末端が欠損した VCH の発現の有無について抗 VCH 抗体を用いて明らかにすることを試みた。図 6A に細胞毒性のない spontaneous VCH 集合体をウサギに免疫して得られたポリクローナル抗 OL-VCH IgG を用いたウエスタンブロットの結果を示した。抗 OL-VCH IgG は、pro-VCH と VCH は認識するが(図 6A2-3)、rP29 を認識しなかった(図 6A1)。そこで、rP29 をウサギに免疫して rP29 に対する抗体(抗 rp29 IgG)作製した。その結果、抗 rp29 IgG は、rp29、pro-VCH、VCH を認識することが分かった(図 6B1-3)。また、抗 rP29 IgG は 65kDa の VCH に比べて pro 領域を持つ pro-VCH の方を認識しやすいように思われた(図 6B2-3)。

この抗 rP29 IgG に反応する成分が 569B 株菌体ペレットの溶解液と 569B

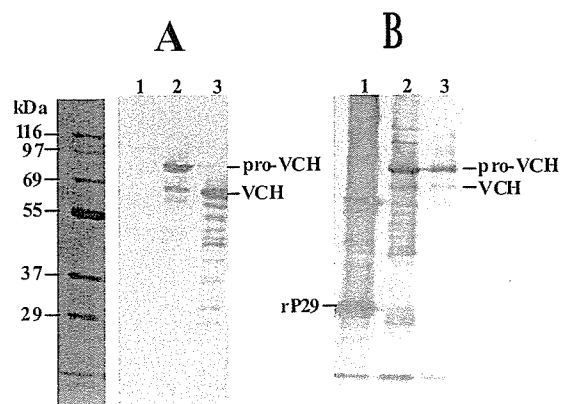


図6. 組み換え VCH に対する抗 VCH 抗体の結合性  
 A: OL-VCH IgG, B: rP29IgG. レーン 1: rP29, 2: pro-VCH, 3: VCH. アクリルアミド濃度: 10%。

株の培養上清中に含まれているかどうかウエスタンブロットを用いて調べた。Cell lysate にのみ抗 rP29 IgG に結合する成分が少なくとも6つ存在することが分かった(45~90kDa、図7)。

次に protein A sepharose に抗 rP29 IgG を結合させたアフィニティカラムを作製し、569B 株の cell lysate から抗 rP29 IgG 結合成分を分離した。569B 株の *hlyA* 配列から発現することが予想された 29kDa と pro 領域が欠失した 12kDa の VCH に相当するタンパク質のバンドは検出されず、90kDa のタンパク質が主要なバンドであることが分かった(図8、レーン1)。この90kDaの抗 rP29 IgG 結合成分を SDS 存在下で加熱処理すると、約 50kDa の分子に分解した(図8、レーン2)。この結果は、90kDa の抗 rP29 IgG 結合成分はサブユニット構造を形成していることを示唆している。また 90 kDa の成分には活性型 VCH が持つ溶血活性や集合体形成能はなかったが、コレステロール結合活性は認められた。

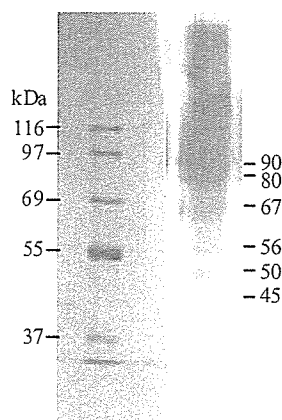


図7. rP29IgG に結合する 569B 株の cell lysate 成分 8%のアクリルアミドゲルで SDS-PAGE 後、ウエスタンブロットを行った。

我々は、この 90kDa の抗 rP29 IgG 結合成分が 569B 株の *hlyA* 遺伝子産物であるかどうかを確認するために、アミノ末端からのアミノ酸配列をエドマン分解法によって解析することを試みた。しかしながら、アミノ末端が修飾されていたので分析できなかった。そこでアミノ末端の脱ホルミル化と脱ピログルタミル化を行ったが、デブロックすることはできなかった。現在、質量分析法によってアミノ酸配列を決定することを検討している。

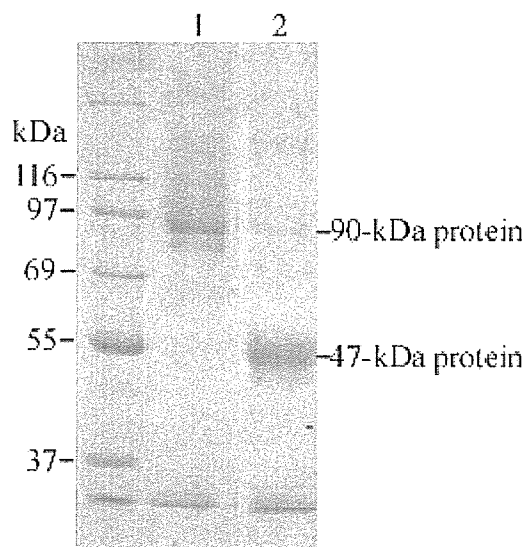


図8. rP29 IgG を結合させたアフィニティカラムクロマトグラフィを用いて 569B 株の cell lysate から分離した VCH 様タンパク質  
レーン 1:未処理、2:SDS 存在下 95℃ で 3 分間加熱処理。  
アクリルアミド濃度：8%。

#### D. 結論

VCH は DMPC-cholesterol 混合単分子膜のマトリックス領域を貫通する傾向があった。これは VCH の膜侵入が膜の構造に依存していることを示唆している。さらに cholesterol 単分子膜に対しても VCH は作用し、膜を貫通していること

を示すデータが得られた。また、cholesterol 単分子膜には円形のドメイン構造が形成されていた。この円形ドメインに出現したドットの突き出ている部分はドメインを形成していない領域に比べて長いことが分かった。この結果は cholesterol 単分子膜の構造によって VCH 分子の高次構造が影響を受けることを示している。

また、古典型コレラ菌 569B 株の cell lysate から VCH のカルボキシル末端欠損体を用いて作製した抗体に結合する分子量 90kDa のタンパク質を分離した。この 90kDa のタンパク質は活性型の 65kDa VCH と同様にコレステロール結合活性を持っていたので、569B 株は VCH 様タンパク質を発現している可能性が高いと考えられた。

#### E. 文献

- (1) R. Olson and E. Gouaux (2005) *J. Mol. Biol.*, **350**, 997-1016.
- (2) N. Saha, K. Kalyan, K.K. Benerjee (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 162-167.
- (3) D. Zhang, J. Takahashi, and T. Honda (1999) *Infect. Immun.*, **67**, 5332-5337.
- (4) H. Ikigai, H. Otsuru, K. Yamamoto, and T. Shimamura (2006) *Microbiol. Immunol.*, **50**, 751-757.
- (5) A.E. Rader and J. Murphy (1988) *Infect. Immun.*, **56**, 1212-1219.
- (6) H. Ikigai, A. Akatsuka, H. Tsujiyama, T. Nakae, and T. Shimamura (1996) *Infect. Immun.*

**64**, 2968-2973.

- (7) Y. Tagami, Y. Oishi, and H. Ikigai (2006) *Colloids. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **284-285**, 475-479.

#### F. 研究発表

##### 学会

- (1) 舟橋伸昭、服部圭一、中山浩伸、大石祐司、千田美紀、千田俊哉、山本耕一郎、島村忠勝、生貝 初：コレステロール結合活性を持つコレラ菌溶血毒の膜侵入、第 78 回日本細菌学会、平成 18 年 3 月、金沢。

##### 論文

- (1) H. Ikigai, H. Otsuru, K. Yamamoto, and T. Shimamura (2006) *Microbiol. Immunol.*, **50**, 751-757.
- (2) Y. Tagami, Y. Oishi, and H. Ikigai (2006) *Colloids. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **284-285**, 475-479.

## 腸管出血性大腸菌の産生する Stx2B への毒素原性大腸菌の LT の粘膜アジュバント効果の解析

辻 孝雄

藤田保健衛生大学医学部微生物学教室

### 研究要旨

毒素原性大腸菌の産生する下痢毒素(heat-labile enterotoxin; LT)は他の抗原と同時経鼻投与すると粘膜アジュバント効果を発揮する。我々の作成した変異毒素(mLT)は他のタンパク質抗原に対し、強い粘膜アジュバント効果を発揮し、抗体産生を増強する(*Immunobiology*. 196, 465-474. 1997.)。そこで、今回抗原性が非常に低く、LTおよびコレラ毒素が粘膜アジュバント効果を示さないと言われている腸管出血性大腸菌の産生する shiga like toxin 2(Stx2)のBサブユニット(Stx2B)に対し、mLTの効果を検討した。その結果以下の点を明らかにした。

我々は Stx2B を C 末端に His-Tag を付け過剰産生、精製した。そして、マウスに mLT と同時経鼻投与した結果、His-Tag のついた Stx2B (Stx2B-His)に対し、血中抗体の産生が増強された。しかも抗 Stx2B-His 抗体は Stx2 の中和能を有していた。さらに、肺洗浄液の抗 Stx2B-His IgA 抗体の産生が増強していた。

以上の結果から、mLT と Stx2B-His の経鼻投与は、Stx2 に対する有効なワクチン刺激手段と考えられる。

### A. 研究目的

毒素原性大腸菌の産生する下痢毒素(heat-labile enterotoxin; LT)はコレラ毒素(CT)と同様に激しい下痢活性を持っている。さらに、他の抗原と同時にマウスなどに経鼻投与すると粘膜アジュバント効果を発揮する。また、我々の報告した LT の変異毒素(mLT)は、種々のタンパク質抗原に対し抗体産生を優位に上昇させる。

そこで、腸管出血性大腸菌の産生する抗原性の低い細胞障害毒素(shiga like toxin 1(Stx1), Stx2)に対し、mLT が粘膜アジュバント効果を発揮するか検討した。

既に、CT および CT の変異体は Stx1B

に対し、粘膜アジュバント効果を発揮すると報告されている。一方、Stx2B に対しその効果は非常に低いといわれている。そこで、我々は千葉大学医学部・細菌学、清水博士の協力を得て、His-Tag を付けた Stx2B の過剰産生系を作成し、精製を行い、抗 Stx2B-His 抗体が mLT で誘導されるか、また誘導された抗体が Stx2 の毒素活性の中和能を持っているか、経鼻投与で検討した。

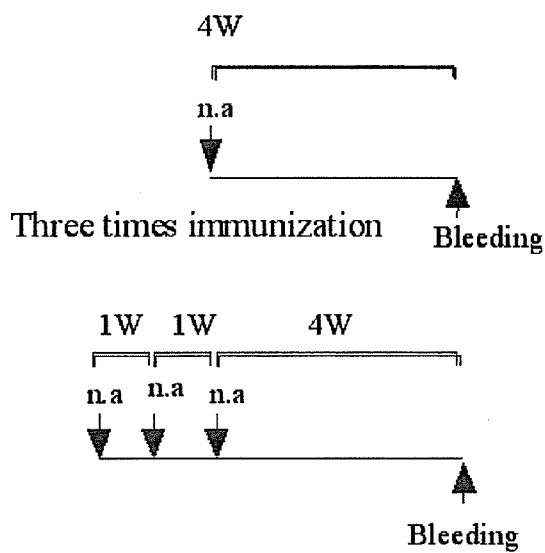
### B. 研究方法ならびに結果

1) Stx2B-His + mLT の ICR マウス経鼻投与による抗 Stx2B-His 抗体の誘導

経鼻免疫は、1回または1週間おきに3回投与し、4週間後に血中抗体価を Stx2B-ELISA で検討した(図1)。

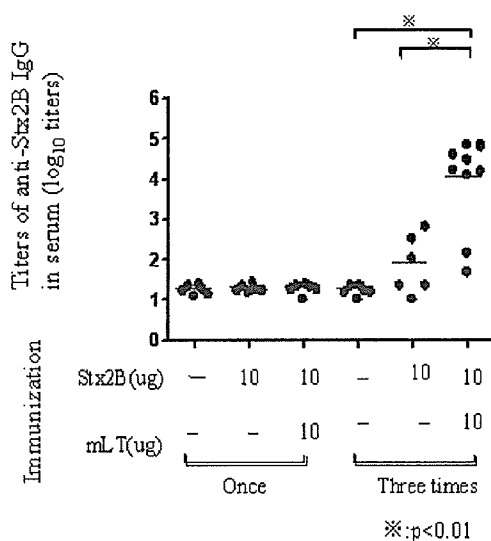
図1

Once immunization



その結果、図2に示すように3回投与した場合、明らかに抗 Stx2B-His 抗体の上昇が認められた。

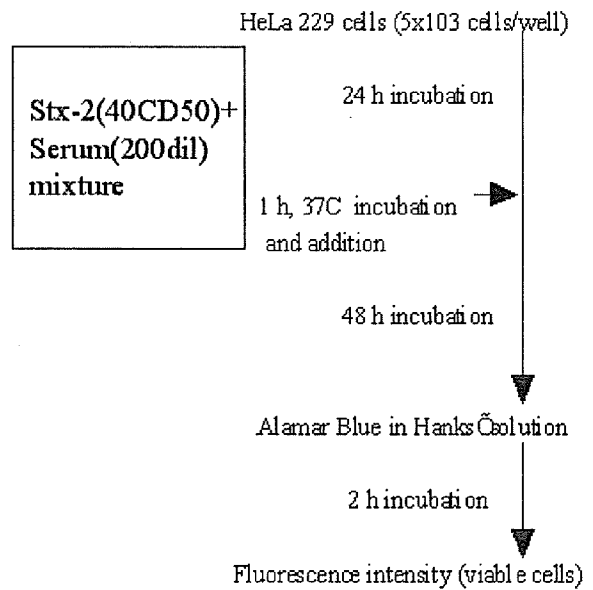
図2



2). マウス抗 Stx2B-His 抗体による Stx2 の中和活性の検討

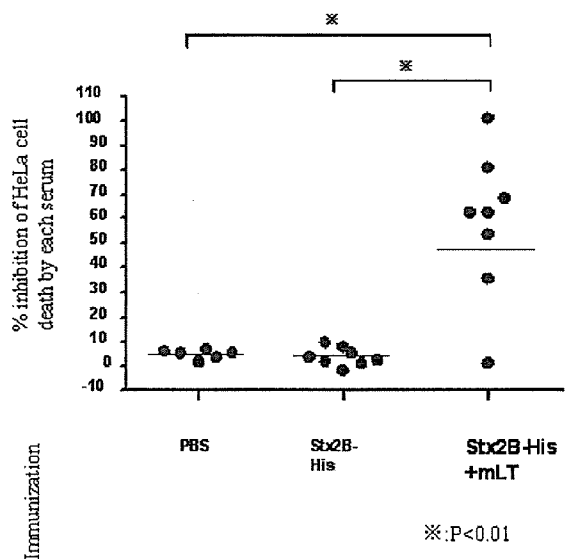
図3に示すようにあらかじめ抗血清で Stx2 を処理し、Hela229 細胞に添付し、Stx2 の細胞致死活性の阻害を検討した。

図3



その結果、図4が示すように、明らかに抗 Stx2B-His 抗体血清は Stx2 を中和した。

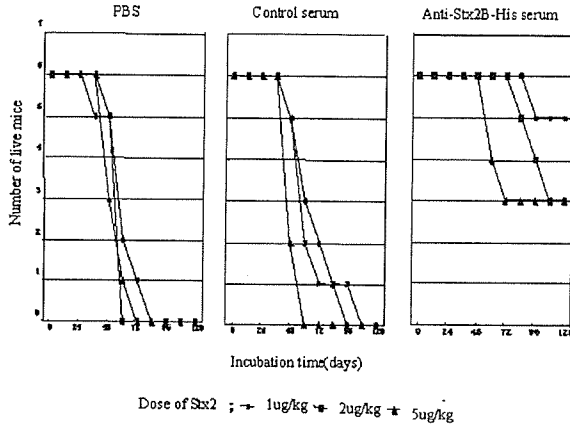
図4





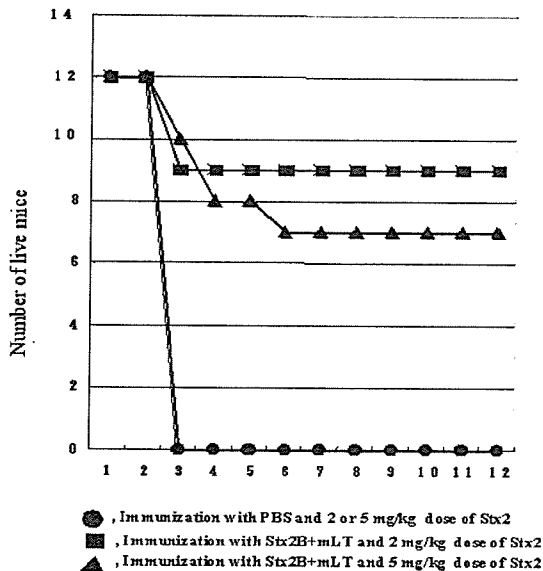
さらに、抗体価の高い抗血清で Stx2 を処理し、腹くう内投与(i.p.)してマウス致死を検討した。図 5(右)に示すように、抗 Stx2B-His 抗体血清で処理した Stx2 のマウス致死活性は減少した。

図 5



一方、事前に図 1 に示すように 3 回免疫したマウスに Stx2 を i.p. 投与して、致死活性の変化を検討した。その結果、図 6 に示すように、事前に免疫したマウスの致死(▲, ■)が減少した。

図 6



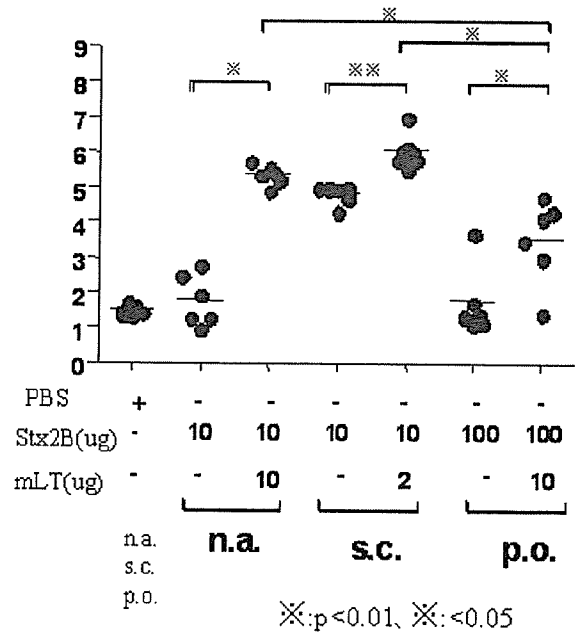
以上の結果から、Stx2B-His+mLT で経鼻免疫して誘導された抗 Stx2B-His 抗体は、Stx2 毒素活性を中和することが明らかになった。

3) 投与方法を代えた場合の抗 Stx2B-His 抗体の上昇の比較

図 1 と同様に 3 回、経鼻(n.a.)、皮下注射(s.c.)、経口投与(p.o.)を行い、4 週間後の血清中抗 Stx2B-His 抗体価を検討した。

その結果、図 7 に示すように皮下注射の場合、mLT の存在如何にかかわらず、抗体産生が認められた。しかし、経口では抗体反応が低いことが明らかになった。

図 7

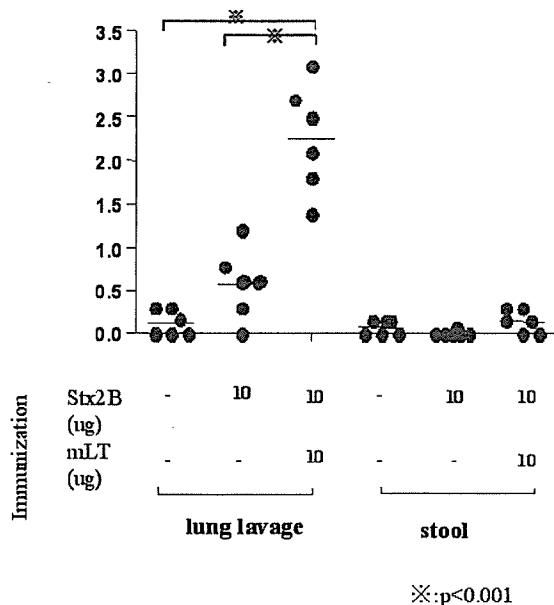


#### 4. 肺洗浄液および糞便中の抗 Stx2B-His IgA 抗体価の検討

腸管出血性大腸菌の経口感染の際に毒素が腸管内で産生された場合、粘膜抗 Stx2B-His IgA 抗体は症状の軽減に重要な役割をされていると考えられる。そこで、図 8 に示すように肺の洗浄液、および糞便中の抗 Stx2B-His IgA 抗体価の検討を行った。その結果、肺洗浄液内には抗 Stx2B-His IgA 抗体が検出されたのに対し、

糞便中には抗 IgA 抗体が検出されなかった。従って、経鼻投与では肺にホーミングできる IgA 産生 B 細胞を誘導されるが、腸管にホーミングできる B 細胞の誘導は非常に低いと考えられる。

図 8



### C. 考察

mLT は同時経鼻投与した種々のタンパク質抗原に対し液性免疫を増強すると報告してきた。そこで、抗原性が低くしかも重篤な病変をおこす腸管出血性大腸菌の産生する Stx1, 2 特に Stx2 の Stx2B に対して、mLT が経鼻同時投与で有効な抗体産生を誘導するか検討した。

その結果、毒素の標的細胞への結合を阻止すると考えられる Stx2B に対する抗体が、Stx2B-His+mLT の経鼻投与で誘導された。

従来、Stx1B+CT の経鼻投与では非常に高い抗 Stx1B 抗体血清が得られるといわれている。しかし、Stx2B に対する誘導

は難しいと考えられている。

そこで、Stx2B に His-Tag を付けることにより、高い抗 Stx2B-His 抗体が誘導された。これは、Stx2B の抗原性が His-Tag を C 末端につけることにより、構造変化がおこり、高い抗体価を誘導したと考えられる。事実、精製 Stx2B-His の一部は、polymer を形成せず dimer が検出されることから、構造変化が想像される。

### D. 結論

mLT を粘膜アジュバントとして用いた経鼻 Stx2B-His 投与により、Stx2 毒性を中和できる抗体が誘導された。従って、Stx2B-His+mLT は腸管出血性大腸菌の経鼻投与ワクチンとして利用できる可能性が示唆された。

### E. 健康危機情報

Stx2 産生性腸管出血性大腸菌は非常に重篤な感染症をおこす。その最大の原因が Stx2 である。そこで、Stx2 産生性菌に感染した際、腸管内で産生された毒素の吸着のための Gb3 誘導體、鶏の抗毒素 IgY 抗体が試みられてきた。一方、Stx2B に対するワクチン開発の問題とされている。

本研究では、Stx2B-His+mLT の経鼻投与で Stx2 を中和出来る抗体産生を誘導することが出来た。そこで、経鼻 Stx2B-His+mLT ワクチンを頻回、手軽に投与することにより、腸管出血性大腸菌感染の症状の軽減に必要な液性免疫を常に高い状態に保てる可能性がある。

### F. 研究発表

(1) Shimizu T, Sasaki K, Kato M, Arimitsu

H, Ochi S, Yano T, Oguma K, Yokochi T, Tsuji T. A mutant of *Escherichia coli* enterotoxin inducing a specific Th1-type of T cells to varicella-zoster vaccine enhances the production of IL-12 by IFN $\gamma$ -stimulated macrophages.

*Vaccine*. 24,3719-3726. 2006.

(2) Kobayashi H, Takahashi E, Oguma K, Fujii Y, Yamanaka H, Negishi T, Arimoto-Kobayashi S, Tsuji T, and Okamoto K. Cleavage specificity of the serine protease of *Aeromonas sobria*, a member of the kexin family of subtilases.

*FEMS Microbiology Letters*. 256, 165-170, 2006

(3) Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin.

24(15):2815-23. *Vaccine*, 2006.

(4) Takahashi H, Sasaki K, Takahashi M, Shigemori N, Honda S, Arimitsu H, Ochi S, Ohara N, Tsuji T.

Mutant *Escherichia coli* enterotoxin as a mucosal adjuvant induces specific Th1 responses of CD4(+) and CD8(+) T cells to nasal killed-bacillus calmette-guerin in mice. 24(17):3591-8. *Vaccine*. 2006

(5) Kakita M, Takahashi T, Komiya T, Iba Y, Tsuji T, Kurosawa Y, Takahashi M.

Isolation of a human antibody with strong neutralizing activity against diphtheria toxin. *Infect. Immun*. 74, 3682-3683. 2006.

## 平成 18 年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業分担研究報告書

課題名：細菌細胞表層多糖抗原のエピトープ解析と血清診断への応用研究

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：

腸炎ビブリオの世界的流行株 03:K6 株の菌体表層多糖抗原であるリポ多糖 (LPS) について、化学構造を主とした解析を行った。03 の LPS 多糖鎖に関しては、昨年度の本報告においてその推定構造を報告したが、本研究により 03 LPS 多糖鎖は 7 種 11 個の糖で構成される低分子糖鎖であることが示され、その全構造が解明された。また、03 LPS 多糖鎖には従来知られていない特殊なシアル酸類似のアミノ糖が存在することを示すとともに、腸炎ビブリオの全血清型 LPS におけるシアル酸類似アミノ糖の分布を検討した。

#### A. 研究目的

腸炎ビブリオは、海産魚介類を主な原因食品とし、世界的に多発する食中毒の原因菌である。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) が存在し、LPS は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ともに、腸炎ビブリオの 13 種類の O 抗原型 (血清型) を決定する因子でもある。しかしながら、抗原型を決定する LPS 多糖鎖の化学的実体が明らかにされているのは O12、O2 および O6 のわずか三つの抗原型であり、その他の抗原型 LPS 多糖鎖の化学的性状は未だ不明である。本研究は、腸炎ビブリオの 13 種の抗原型すべての LPS 多糖鎖の構造を明らかにすることにより、各抗原型のエピトープを解明し、エピトープの構造に基づく腸炎ビブリオの正確な血清診断に応用することを主目的とするもので、その研

究の一環として、腸炎ビブリオ 03 LPS 多糖鎖の化学構造とエピトープの解明を目指した。

#### 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