

Cells Reveals a Prominent Role for p38 MAPK in ATF-2, CREB Protein, and NF- κ B Activation. 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 平成20年9月7日～9日11日. 淡路市

12. 中島悠次郎、磯本一、久恒順三、中山真彰、河野茂、平山壽哉: *Helicobacter pylori* 感染胃粘膜における CCL20, CXCL13 発現の検討. 第61回日本細菌学会九州支部総会. 平成20年10月3日～10日4日. 熊本市
13. 平山壽哉: ピロリ菌 VacA 毒素は p38 MAP kinase/ATF-2 経路を介した COX-2 の発現を促し PGE₂ 産生させる. 第67回日本癌学会学術総会, 平成20年10月28日～30日、名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

Vibrio cholerae の可変 DNA 領域を標的とした
新規 DNA フィンガープリンティング法の開発

研究分担者 大澤 朗 神戸大学教授

研究要旨：

コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) の血清型 01 および 0139 はゲノム DNA が高度に保存されていることから、通常有用な PFGE やリボタイピング法では菌株間の clonality (系統性) の異同の識別は難しいとされている。しかし、最近我々が行ったゲノムサブトラクション法による遺伝子解析で、*V. cholerae* の小染色体上に存在する Integron Island 領域に菌株レベルでの多型性が存在することが示唆された。そこで、我々は本領域に多数散在する *V. cholerae* repeat (VCR) に注目し、この散在性を利用した新規 DNA フィンガープリンティング法の開発を試みた。VCR を利用したプライマーの有用性を検討したところ、VCR-5' +C と VCR-3' +A の組み合わせが最も優れた識別能を示した。また本プライマーセットを用いて得られた泳動図を基にデンドログラムを作製したところ、01 は 1990 年を境に系統的な違いが確認され、異なる 6 つのグループに分類することが可能であった。一方 0139 は、独自のグループを形成するものの、1990 年以後分離された 01 と酷似するパターンを示し、01 との系統的関連性を示唆する結果となった。本手法は、MLST や PFGE と比べ、簡便かつ迅速に結果が得られるため、病原性 *V. cholerae* の疫学解析に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

V. cholerae は世界規模で広く蔓延し、多くの死者を出している腸管病原細菌である。これまでの知見から、コレラ毒素産生性の 01 及び 0139 血清型の株がコレラ症を引き起こすことが明らかとなっている。我が国におけるコレラの被害は、他のアジア諸国と比べるとまれであるが、その症例は過去 30 年で漸増してきている。これはコレラ症が流行している国々へ渡航する旅行者が増加していることが主な原因であると考えられる。しかしながら、渡航歴がないにもかかわらず国内で発症した例もあるため、すでに病原性 *V. cholerae* 株が日本国内にニッチを形成している、あるいは食品

を通じて生きてきたままコレラ菌が海外から輸入されている可能性が考えられる。近年、日本はますます海外からの食料供給に依存するようになってきているため、*V. cholerae* に汚染された輸入食品によっていつ大規模な流行が引き起こされるか分からない。この状況は、他の先進国でも同様である。これらのことから、現在はコレラによる感染症の感染源および伝播経路を特定し、コレラ感染の流行を最小限に食い止めることが最も重要であると考えられる。そこで我々は正確かつ迅速にコレラ感染源および感染経路を特定するための疫学解析の手法を開発する目的で実験を行った。

B. 研究方法

1) 供試菌株: 01 型 19 株、0139 型 18 株の計 37 株のコレラ毒素産生性 *V. cholerae* を用いた (Table. 1)。01 型株は 1971 年から 1997 年の間にアジアや南米諸国から分離され、0139 型株は 1993 年から 2006 年までにアジアやヨーロッパ諸国、デンマークから分離された。

2) Integron island の相同性解析: 過去に行ったゲノムサブトラクション法を用いた解析により、Integron Island と呼ばれる領域が *V. cholerae* の可変 DNA 領域であることが示唆された。全塩基配列が決定されている *V. cholerae* N16961 株の Integron Island の DNA 配列をウェブ上のプログラムである BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) を用いて Genbank に登録されている他の *V. cholerae* 株のシーケンス (whole genome shotgun sequence) と比較した。

3) VCR を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発: Integron Island の相同性解析の結果、本領域に菌株ごとに多型性が見られる可能性が示唆されたため、本領域に多数存在する VCR を標的とした PCR に基づく手法の確立を試みた。PCR に最も適したプライマーセットや条件を決定するため、全ゲノム DNA 配列が利用可能な *V. cholerae* N16961 株の塩基配列をもとに、VCR に「挟み込まれた」領域にある DNA 配列を増幅するようなプライマーを設計し (Fig. 1)、N16961 株の DNA を用いて条件検討を行った。さらに、最適化された PCR 条件を使用し、供試菌株 37 株における多様性を解析した。以下、本 DNA フィンガープリンティング法を VCR-PCR 解析とする。

4) 系統解析: 方法 3) の VCR-PCR を用いて、得られた増幅 DNA 断片の解析を BIO-PROFIL

Bio-ID++ Windows Application version 11.06 (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) を用いて行い、the unweighted-pair group method with arithmetic means (UPGMA) 法によりデンドログラムを作成した。

5) Chokesajjawatee らの報告した ERIC-PCR 法との比較: 今回我々が開発した手法の有用性を検討する目的で、近年 Chokesajjawatee ら¹¹⁾ によって報告された ERIC-PCR との比較を行った。

C. 研究結果

1) Integron Island の相同性解析: BLAST プログラムを用いた相同性解析の結果、Integron Island は株間で変化に富むことが明らかとなった。

2) VCR を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発: VCR の 5' 末端及び 3' 末端の配列を用いて設計したプライマーセット (VCR-5' , TCCCTCTTGAGGCGTTTGTTA & VCR-3' , AGCCCCTTAGGCGGGCGTTA) を用いて PCR を行ったところ、どのような条件で PCR を行ってもスメアパターンとなった。そこで、PCR 産物を減ずる目的で各プライマーに任意の塩基を一塩基付加したプライマーセットを作製し、最も良いプライマーセットの検討を行った。その結果、VCR5' +C (TCCCTCTTGAGGCGTTTGTTAC) と VCR3' +A (AGCCCCTTAGGCGGGCGTTAA) を組み合わせた PCR が最も優れた識別能を示した。そこで、本プライマーセットを用いて全 37 株を供試して解析を行ったところ、01 は 7 つの異なるパターンを示した。一方で 0139 全株は独特な単一のパターンを示した (Fig. 2)。

3) 供試菌株の系統解析: VCR-PCR の泳動パターンより描かれたデンドログラムにお

いて、90%の相同性をもとに各分離菌株を系統分けしたところ、全 37 株を異なる 7 つのグループに分類できた (Fig. 3)。01 株については 1990 年以前に分離された株と 1990 年以後に分離された株との間に系統的な差が見られた。また 1990 年以後に分離された株間では南米より分離された株がその他の株と系統的に分けられた。これとは対照的に、0139 株は分離された土地や年に関わらず同一の系統であることが示された。

4) Chokesajjawatee らの報告した ERIC-PCR 法との比較：供試したすべての菌株が 90%以上の相同性を示し、01 と 0139 を分類することはできなかった。

D. 考察

過去に行ったゲノムサブトラクション法を用いた解析より、Integron Island が可変異部位であると考えられたため、Integron Island の相同性解析を行った。その結果、本領域が菌株ごとに多様である可能性が示唆された。そこで本領域に多数存在する VCR を標的とした PCR 法に基づく手法の確立を試みた。VCR の 5' 末端及び 3' 末端の配列を用いて設計したプライマーセット (VCR-5', TCCCTCTTGAGGCGTTTGTTA & VCR-3', AGCCCCTTAGCGGGCGTTA) を用いて PCR を行ったところ、どのような条件で PCR を行ってもスメアパターンとなった。我々はこの原因がプライマーのアニール箇所が多過ぎるためではないかと考え、各プライマーに任意の塩基を一塩基付加したプライマーを設計し、様々な組み合わせで再度条件検討を行った。その結果、目視可能な泳動図が得られ、その中でも VCR5' +C (TCCCTCTTGAGGCGTTTGTTAC) と VCR3' +A (AGCCCCTTAGCGGGCGTTAA) を組み合わせた PCR が最も優れた識別能を示すことが明

らかとなった。そこで、このプライマーセットを用いて供試菌株 37 株における多様性を確認したところ、01 は 1990 年を境に系統的な違いが確認され、異なる 6 つのグループに分類することが可能となった。一方 0139 は、独自のグループを形成するものの、1990 年以後分離された 01 と酷似するパターンを示し、01 との系統的関連性を示唆する結果となった。さらに、我々は本 PCR 法の有用性を検討する目的で、近年報告された Chokesajjawatee らが開発した ERIC-PCR との識別能の比較を行った。その結果、ERIC-PCR では全株が同一クローンであると認識されたのに対し、VCR-PCR では 7 つのグループに系統分けすることが出来たことから、本手法がより識別能に優れた手法であることが明らかとなった。本手法は PCR に基づく手法であり、PFGE や MLST などのような特別な機器を必要とせず、簡便かつ迅速に結果が得られるため、一日に大量サンプルを供試することも可能である。これらのことから本フィンガープリンティング法は病原性 *V. cholerae* の系統解析に有用であると考えられる。現在、VCR-PCR の信頼性のさらなる検証を行うため、菌株数を増やして解析を進めているところである。

E. 結論

病原性コレラ菌株の Integron Island の多型性を標的とした、01 と 0139 を識別できるだけでなく、01 内での系統解析も可能な新規 DNA フィンガープリンティング法を開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

徳永暁彦，大澤朗，森田昌知，荒川英二，
渡辺治雄「*Vibrio cholerae* の可変 DNA 領域を標的とした新規 DNA フィンガープリン
ティング法の開発」第 42 腸炎ビブリオシン
ポジウム (2008. 10)

徳永暁彦，大澤朗，森田昌知，荒川英二，
渡辺治雄「*Vibrio cholerae* の可変 DNA 領域を標的とした新規 DNA フィンガープリン
ティング法の開発」第 43 回日米コレラ・
細菌性腸管感染症専門部会 (2008. 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

1) Nipa Chokesajjawatee, Young-Gun Zo,
and Rita R. Colwell (2008).
Determination of clonality and
relatedness of *Vibrio cholerae* isolates
by genomic fingerprinting, using
long-range repetitive element
sequence-based PCR. Appl. Envir.
Microbiol. 74: 5392-5401.

Fig. 1. Schematic drawing of the VCR-PCR.

Assuming that strains A and B have VCRs at different positions, the resultant PCR amplicons between each primer set (VCR-F and VCR-R) are expected to vary accordingly to show different electrophoretic patterns on a gel.

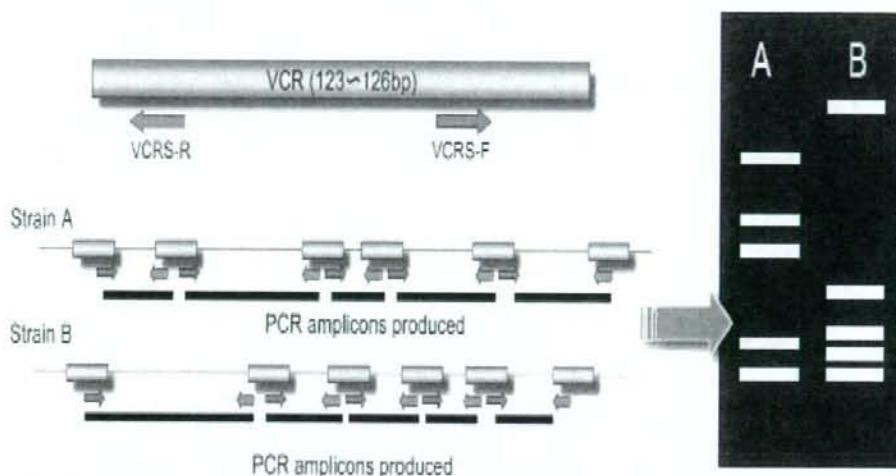


Table 1. *V. cholerae* strains used in the present study.

No.	strain	serogroup	Origin	year	No.	strain	serogroup	Origin	year
	N16961	O1 (Inaba)	Bangladesh	1971	19	1008-96	O139	Hong Kong	1996
1	1002	O1 (Inaba)	Japan	1978	20	1010-94	O139	Denmark	1994
2	1003	O1 (Inaba)	Japan	1969	21	1056-93	O139	Thai, India	1993
3	1010	O1 (Inaba)	India	1991	22	1180-93	O139	Bangladesh	1993
4	Q5	O1 (Inaba)	Indonesia	1969	23	184-93	O139	Bangladesh	1993
5	1001	O1 (Ogawa)	Japan	1977	24	199-98	O139	India	1998
6	1004	O1 (Ogawa)	Japan	1991	25	21-93	O139	India	1993
7	1005	O1 (Ogawa)	Peru	1992	26	234	O139	China	2004
8	1006	O1 (Ogawa)	Bolivia	1992	27	236-93	O139	India	1993
9	1006	O1 (Ogawa)	Bali	1995	28	252	O139	Japan	2006
10	1009	O1 (Ogawa)	India	1991	29	294-94	O139	Thai	1994
11	1011	O1 (Ogawa)	Mongolia	1996	30	296-95	O139	Thai	1994
12	11	O1 (Ogawa)	Thai	1997	31	387-94	O139	Singapore	1994
13	14	O1 (Ogawa)	Thai	1997	32	435-94	O139	Thai	1994
14	19	O1 (Ogawa)	Singapore	1997	33	495-93	O139	Nepal	1993
15	39	O1 (Ogawa)	China	1997	34	515-95	O139	Bangladesh	1993
16	5	O1 (Ogawa)	Thai	1997	35	63-93	O139	India	1993
17	58	O1 (Ogawa)	Philippines	1997	36	695-94	O139	Bangladesh	1994
18	81	O1 (Ogawa)	Thai	1997					

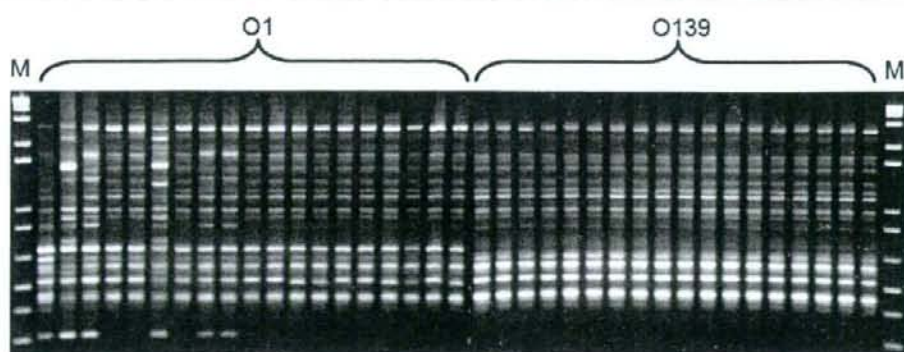


Fig. 2. VCR-PCR patterns of *V. cholerae* O1 and O139 strains on an agarose gel.

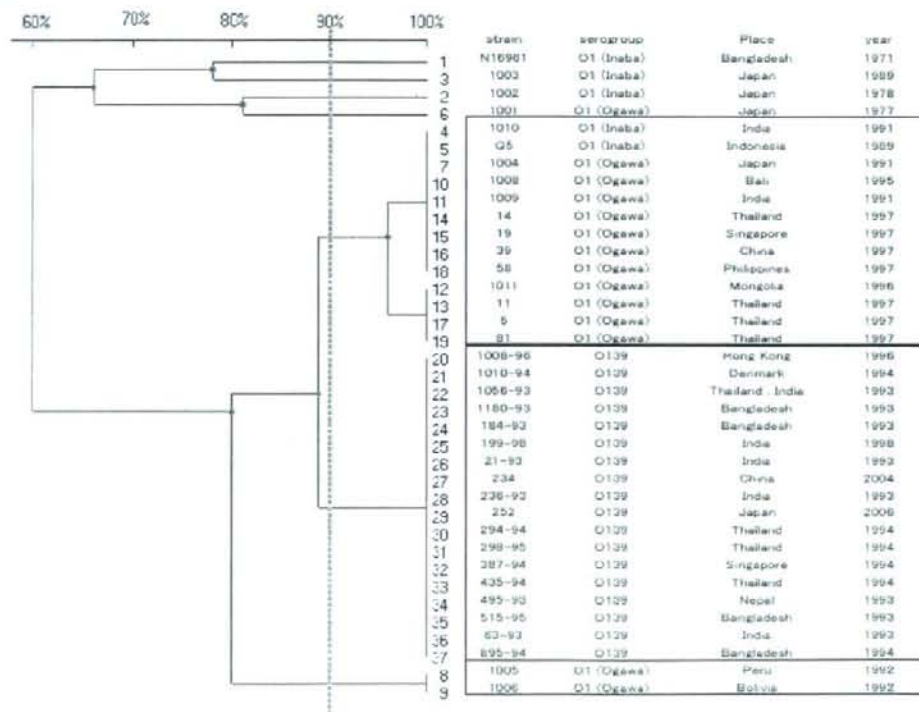


Fig. 3. Variability in similarities of VCR-PCR fingerprints.

下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な生菌遺伝子検査法の作成に関する研究

研究分担者 江崎 孝行 岐阜大学教授

研究要旨：

細菌性食中毒をおこす病原体 10 種類（大腸菌、セレウス菌、リステリア菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、赤痢菌、腸炎ピブリオ、コレラ菌、腸炎エルシニア菌、カンピロバクター）を一つの増幅試薬で検査するカクテル試薬を作成し、増幅産物を識別するビーズアレイを作成した。さらにこの方法で食材中の食中毒病原体を一種類の培地で 4 時間培養することで、網羅的に 10 種類の病原体遺伝子の遺伝子を高感度にスクリーニングする方法を作成した。

この方法でサルモネラや大腸菌の検査に求められる 25g の食材に 1 個の病原体がいても検出できる高感度検出方法を作成した。

A. 研究目的

安全な食品を供給するためには食品の病原微生物検査を迅速に漏れなくスクリーニング方法が必要になる。従来の培養検査では時間がかかるため新鮮な食材の検査方法は迅速さが要求される。遺伝子検査は迅速であるが食材から直接遺伝子検査を行おうとすると死菌の核酸を補足したり、食材中の阻害物質があり十分な感度が検査感度に到達できない。そこで、短時間培養法と併用することで生きた菌を高感度（サルモネラで 25g 中 1 個）に検出する方法を目指した。

B. 研究方法

食材は 10 倍量の生理食塩水を加えた後ストマッカーで攪拌した。通常の食品検査では 1ml の混合液を炭酸ガスで満たした独自処方の培地に加え 4 時間 35 度で培養した。4 時間培養液、1ml から核酸を抽出し、10 種類の tag 付き特異カクテルプライマーで

標的病原体の核酸を増幅した。サルモネラの検出系では食材の 10 倍量の緩衝ペプトン水を混合子 4 時間培養後、培養液 1ml を遺伝子検査に使用した。増幅産物はビーズにプローブを固定したビーズアレイ法を使用し、ピペットにビーズを充填し、検出系は化学発光を使用し測定した。

C. 研究結果

10 種類のプライマーを混合したカクテルで増幅した PCR 産物を識別するためのビーズアレイ法を作成し、下記の表 1 の病原体の増幅産物を識別する方法を作成した。また生きた菌を高感度に検出するため培養を 4 時間行うことでサルモネラが食材 25g 中 1 個存在していても検出できる系を作成した。

D. 考察

10 種類の病原体を 4 時間培養法で高感度に検出できる系を作成した。4 時間培養に

使用する培地は非選択培地で炭酸ガスが入っているためカンピロバクターも増菌させ、検出することができた。通常のプロトコールでは食材を 10 倍量の培地と混釈したあと 1 ml を培養に使用するため感度が落ちるが、サルモネラのように高感度検査が要求される場合はストマッカーで混合した材料をそのまま 4 時間培養することで 25g 中に 1 個の病原体がいても検出ができた。今後はこの方法を糞便中のサルモネラ菌や大腸菌 0157 の保菌者検査法にも応用し、糞便中の病原体を高感度に捕捉する方法に応用したい。

E. 結論

培養法と遺伝子検査法を併用することで高感度で網羅的な検査方法を作成できた。またカクテル増幅産物を迅速に識別するビーズアレイ法を作成し、増幅産物を短時間で特異的に識別する方法を完成させた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

江崎孝行 中毒細菌の検出・同定システムの新展開：カクテル増幅法をつかった食品中の生きた菌の網羅的な遺伝子検査法、第 30 回 日本食品微生物学会総会 教育講演抄録、岡山、2008 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許出願済み

国際特許出願済み

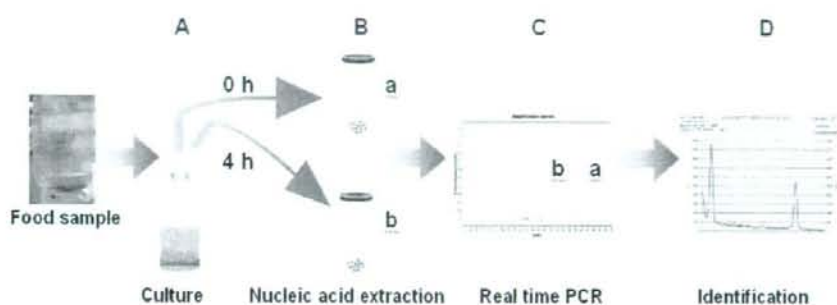


図1. 4時間培養法と生菌検査法

ストマッカーで混合した食材を4時間培養し0時間と4時間の培養液の核酸の増幅量を比較する。生菌があれば増幅するので(step C)生きた病原体がいたことを判定できる。増幅産物は図2の化学発光ビーズで識別した。

Bacteria	Target gene ^a	Amplicon (bp)	T _m value (°C)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>nhe</i>	123	81-82
<i>Campylobacter jejunii</i> group	16S rRNA	240	81-82
<i>Escherichia coli</i>	<i>dnaJ</i>	130	82-83
<i>Bacillus cereus</i>	<i>cesB</i>	140	81-82
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>dnaJ</i>	86	81-82
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>dnaJ</i>	140	83-84
<i>Salmonella</i> spp.	<i>InvA</i>	262	84
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ctxA</i>	137	84-85
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	217	81-82
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>dnaJ</i>	237	84

表1. カクテル増幅に使用した遺伝子と増幅産物の長さ、T_m値

a. *nhe*, nonhaemolytic enterotoxin gene; *cecB*, cereulide synthetase B gene; *invA*, invasion gene; *ctxA*, cholerae toxin A gene; *tdh*, thermostable direct hemolysin gene; *dnaJ*, dnaJ protein gene;

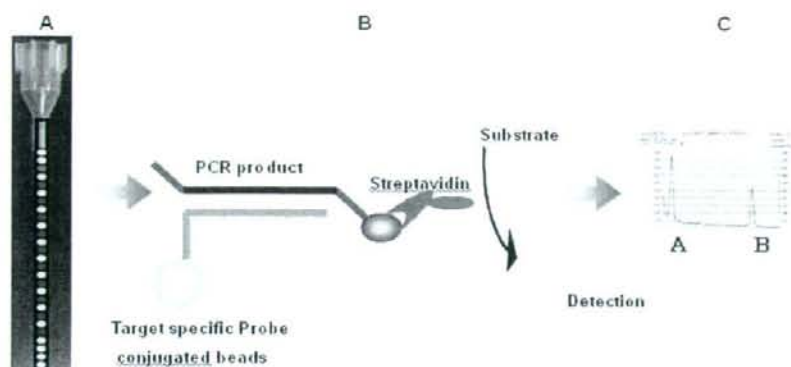


図 2. ビーズアレイの検出系。 ビーズに固定したプローブをピペットのチューブ内に入れ、biotin 標識 PCR 産物と反応させ、化学発光を起こさせチップの位置情報を基にどのプローブが反応したかを定量した。図の StepC の A は陽性コントロール、B は標的プローブ。

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金
社会保障国際協力推進研究事業（国際医学協力研究事業）分担研究報告書

Stx1B, Stx2B の共通抗原決定基の決定とそれを利用した粘膜ワクチンの開発

研究分担者 辻 孝雄 藤田保健衛生大学教授

研究要旨：

腸管出血性大腸菌の志賀毒素粘膜ワクチンアジュバントとして用いるコレラ毒素 B サブユニットの大腸菌過剰発現系を構築した。発現産物(rCTB)は、CTB 遺伝子全長をクローニングしたプラスミドで形質転換した大腸菌の菌体抽出液から精製され、構造及びガングリオシドに対する結合特異性は、コレラ菌由来のものと同であった。発現のインデューサーであるリンコマイシンは、ラクトースオペロンに作用していたが、IPTG での発現系とは性質を異にすると考えられた。本方法は IPTG の添加が不要で、リンコマイシン添加した培地で培養するだけで発現誘導される、簡便で有用な方法であると考えられた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素 Stx1 と Stx2 は血便、溶血性貧血を始め、溶血性尿毒症症候群 (HUS) の原因毒素である。本感染症の予防には両毒素を中和するワクチン抗原の開発と同時に、毒素の侵入を阻止する粘膜抗体を効率的に腸管粘膜に誘導するアジュバントの開発が望まれる。

コレラ毒素 (CT) は毒素原性大腸菌の産生する易熱性毒素 (LT) とアミノ酸及び塩基配列レベルで約 80% の相同性を示し、1 分子の A サブユニット (CTA, LTA) と 5 分子の B サブユニット (CTB, LTB) で構成される下痢毒素である。両毒素の弱毒ないし無毒変異毒素や B サブユニットは、ワクチン抗原とともに経鼻または経口投与することによって、強力な粘膜アジュバ

ント活性を示すことが知られている。しかしながら LT との類似性にも関わらず、大腸菌での CT、CTB 過剰発現系の構築例は低発現、不溶性画分への発現の他、宿主大腸菌への毒性などが挙げられ、意外に少ない。また、抗原となる Stx においても同様に過剰発現系が作製されておらず、ワクチン開発の障害となっている。

我々はアジュバント研究に利用する LTB について、大腸菌でのリコンビナント発現系を構築していたが、この発現菌株の培養液にリンコマイシンを添加しておくこと、LTB の発現量が増強することを見出した。我々はこの現象に着目し、この系が発現量の少ない CTB 延いては CT ホロ毒素や Stx の過剰発現系に応用できるのではないかと考え、ワクチン抗原及び粘膜アジュ

バントとしてのこれらの毒素の過剰発現系の構築を試みた。

B. 研究方法

1) 供試菌株: ゲノム DNA の供試菌株として *V. cholerae* 569B 株を用いた。また宿主大腸菌として MV1184 株を用いた。

2) リコンビナント CTB (rCTB) 発現プラスミドの作製: CTB の全長を増幅させるプライマーを設計し、上記コレラ菌ゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。これらの増幅産物を pBluescript II SK(+)(pBSK) の LacZ 内 MCS にある *EcoRI* 及び *HindIII* 切断サイトに挿入した。なお CTB 発現プラスミドは、上記の方法で作製した LTB 由来 SD 配列を上流に持つ pBSK-CTB、または pBSK-CTB を鋳型にして Site-directed mutagenesis により作製した、CTB 由来の SD 配列を持つ pBSK-CTB2 の 2 種類を作製した。

3) rCTB の発現及び精製: 上記各プラスミドで大腸菌 MV1184 株を形質転換し、リンコマイシンを 90µg/ml に添加した CAYE 培地で 37℃ または 30℃ で培養した。菌体を回収し、超音波破碎した後の遠心上清を粗抽出溶液とした。これを Uesaka らの方法に従って、ガラクトース固定化ゲルで精製後、わずかに残る夾雑蛋白を除去するため、CM セファデックス陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。

4) rCTB のガングリオシドに対する結合特異性の評価: GM1, GD1b, GT1b, Asialo GM1 に対する結合性の評価は

Biacore2000 を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて解析した。対照にはコレラ菌 569B 株の培養上清より精製した CT (Native-CT) を用いた。

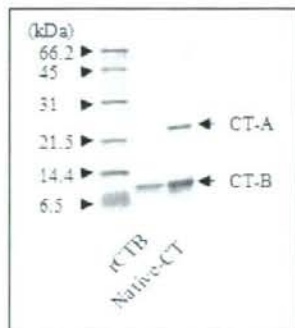
C. 研究結果

1) rCTB の発現: pBSK-CTB で形質転換した大腸菌をリンコマイシン添加した CAYE 培地で培養することにより、この菌体溶解液中に抗 CTB 血清を用いたウェスタンブロット解析で

	Times after induction			
	3 hours		6 hours	
LM	-	+	-	+

(図 1 形質転換菌株におけるリンコマイシン (LM) で誘導された rCTB の発現)

反応するバンドが認められた(図 1)。このことから 1L 培養を行い、超音波破碎液からの精製を試みた。精製産物は SDS-PAGE において Native-CT の B サブユニットと同じ移動度を示し(図 2)、また N 末端アミノ酸配列 10 残基

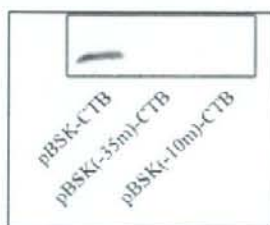


(図 2 rCTB の SDS-PAGE 像)

も Native-CT と同じく TPQNITDLCA であった。さらに最終収量は 1L 培養あたり 19mg と高収量であった。この

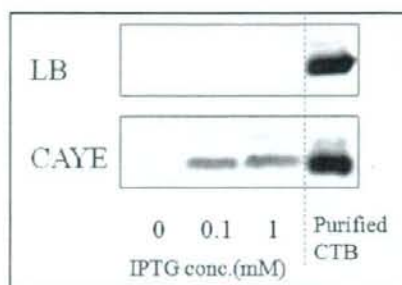
ことから、宿主菌株と homogeneous な LTB の SD 配列を利用したことが功を奏したと当初考えられたが、CTB の SD 配列を持つ pBSK-CTB2 での形質転換株でも同程度の発現・精製効率が示された。またこれまで報告されてきたような CTB 由来のシグナル配列を利用したことによる、宿主大腸菌への発現毒性も認められなかった。

本発現系ではリンコマイシンの添加が発現のインデューサーになっているが、その作用メカニズムは分かっていない。そこで本剤が pBSK の CTB 遺伝子クローニング領域上流に存在する lac または T3 プロモーターのいずれに作用するのかを調べるため、変異プラスミドを作製したところ、lac プロモーターの変異体においてリンコマイシンでの発現が阻害された(図 3)。



(図 3 リンコマイシン存在下で培養した pBSK-CTB 及び lac プロモーター変異プラスミド pBSK(-35m)-CTB、pBSK(-10m)-CTB 形質転換株での CTB 発現)

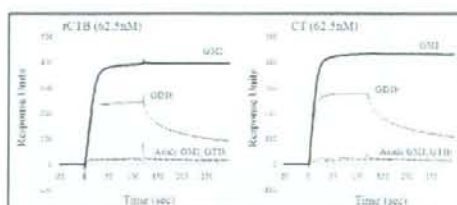
このことから、リンコマイシンはラクトースオペロンに作用した結果、中途の CTB 遺伝子を発現させているものと考えられた。従って IPTG により同様の発現ができることも予想されたが、図 4 に示すように定法に従った IPTG 誘導では、CAYE 培地で発現するものの LB 培地では発現せず、また



(図 4 LB 培地及び CAYE 培地で培養した pBSK-CTB 形質転換株での、rCTB 発現に対する IPTG の効果)

LB 培地を用いた場合には、リンコマイシンを添加しておいても発現できなかった(データ示さず)ことより、本発現系はリンコマイシンの添加以外に、培地成分によっても最適化されている方法であると考えられた。

2) 精製産物の生物活性: rCTB の生物活性を評価するために、CT のレセプターであるガングリオシドに対する結合特異性を SPR 法で評価し、Native-CT の活性と比較した。その結果、GM1 に対して極めて強固な結合性を示すと共に、GD1b にも親和性が示された(図 5)。一方で、Asialo GM1 への結合性は示さないという LTB との相違点も Fukuta らの報告(1988)と一致した。



(図 5 ガングリオシドに対する rCTB 及び Native-CT との結合性の比較)

D. 考察

大腸菌での rCTB 過剰発現系での蛋白の低発現や宿主大腸菌への毒性に、CTB 固有のシグナル配列が大腸菌と適合しないことを挙げる報告があり、これまで報告されている大腸菌での過剰発現系はプロモーターのみならず、シグナル配列も異種蛋白のものに置換したものである。しかし、これらの発現系には発現蛋白の不溶化や異種シグナル配列に伴う末端の余剰配列付加などの新たな欠点をかかえるものも少なくない。今回の発現系では、CTB 固有のシグナル配列を保存したまま、大腸菌ベクターにクローニングした CTB 遺伝子が、大腸菌において毒性を示すことなく可溶性蛋白として発現できることが示された。また精製された rCTB の N 末端アミノ酸配列やガングリオシドに対する結合特異性が、Native-CT のものと同一であったことより、CTB のシグナル配列は大腸菌発現系において有害ではなく、むしろ機能的な末端修飾をするために重要であることが示された。

本発現系での CTB の高発現のインデューサーは図 1 の結果よりリンコマイシンであり、図 3 の結果よりラクトースオペロンに作用した結果であることが明らかであるが、図 4 で示されたように IPTG とは作用点が異なるようであり、この誘導が転写、翻訳いずれのレベルで制御されているのかは、現在のところ不明である。しかしながら、ETEC による LT またはコレラ菌による CT 産生が、培地へのリンコマ

イシン添加により増強することが Levner らにより報告されている(1977)。今回の発現誘導は、lac オペロンを介したものであることから野生株とは異なるが、リンコマイシンによって誘導される本発現系でのシグナルの解明が、延いては野生株における毒素遺伝子の発現機序の解明の一助となるものと考えられる。

この過剰発現系は、IPTG での誘導を必要とせず、培養開始時からリンコマイシンを添加しておくことにより、発現を誘導できる点で、簡便で有用な発現系である。また、この方法は LTB、CTB に特化した方法ではなく、我々は最近 CT ホロ毒素の過剰発現にも応用できることを確認し、その変異毒素の作製も行っている。将来的にはこの発現系を CT や LT のみならず、ワクチン抗原としての Stx 無毒変異毒素の過剰産生系の構築にも応用させたいと考えており、現在その検討を行っている。

E. 結論

リンコマイシンで誘導されるラクトースオペロンを介した rCTB の過剰発現系を作製することに成功した。発現産物はコレラ菌の発現産物と同じ構造と活性を持つことから、本発現系は粘膜アジュバント研究のための変異毒素作製のツールとして有用である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin

Tsuji T., Shimizu T., Sasaki K., Shimizu Y., Tsukamoto K., Arimitsu H., Ochi S., Sugiyama S., Taniguchi K., Neri P., Mori H.

Vaccine 2008;26(4):469-76

A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2

Tsuji, T., Shimizu, T., Sasaki, K., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Taniguchi, K., Noda, M., Neri, P., Mori, H.

Vaccine 2008;26(17):2092-9

Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D

Tsukamoto K., Kozai Y., Ihara H., Kohda T., Mukamoto M., Tsuji T., Kozaki S.
Microb Pathog. 2008;44(6): 484-493.

Molecular properties of each subcomponent in *Clostridium botulinum* type B haemagglutinin complex

Arimitsu H., Sakaguchi Y., Lee JC., Ochi S., Tsukamoto K., Yamamoto Y., Ma S., Tsuji T., Oguma K.

Microb Pathog. 2008;45(2):142-9.

2. 学会発表

リンコマイシンで誘導されるコレラ毒素 B サブユニット大腸菌発現系の構築

有満秀幸、越智定幸、塚本健太郎、佐々木慶子、小熊恵二、辻 孝雄

表面プラズモン共鳴を用いたボツリヌス神経毒素と受容体の結合解析
塚本健太郎、越智定幸、有満秀幸、幸田知子、小崎俊司、辻 孝雄

毒素原性大腸菌 H10407 株の Ent プラスミドの全塩基配列決定

越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷 郁、佐々木慶子、加藤道夫、清水 徹、辻 孝雄

志賀毒素 1 と 2 の交叉中和抗体を誘導する経鼻投与 Stx2B ワクチン

大野周子、佐々木慶子、清水 健、塚本健太郎、有満秀幸、越智定幸、Paola Neri、森 裕志、辻 孝雄

(以上第 81 回日本細菌学会 (京都市))

毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの全塩基配列決定と解析

越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷 郁、佐々木慶子、加藤道夫、清水 徹、辻 孝雄

(第 55 回毒素シンポジウム(山梨))

リンコマイシンで誘導されるコレラ毒素 B サブユニット大腸菌発現系の

構築

有満秀幸、塚本健太郎、越智定幸、佐々木慶子、辻孝雄

毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの全塩基配列決定と解析

越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷 郁、佐々木慶子、清水 徹、辻 孝雄

(以上第 20 回微生物シンポジウム (岐阜市))

大腸菌におけるコレラ毒素過剰発現系の構築

有満秀幸、塚本健太郎、越智定幸、佐々木慶子、辻 孝雄

毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの塩基配列解析

越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷 郁、佐々木慶子、加藤道夫、清水 徹、辻 孝雄

ポツリヌス神経毒素受容体としての糖脂質およびリン脂質の役割

塚本健太郎、越智定幸、有満秀幸、佐々木慶子、辻 孝雄

(以上第 45 回日本細菌学会中部支部総

会 (金沢市))

Surface plasmon resonance analysis of botulinum neurotoxin binding for lipid receptors.

Kentaro Tsukamoto, Sadayuki Ochi, Hideyuki Arimitsu, Tomoko Kohda, Takao Tsuji and Shunji Kozaki
Toxin2008 Baveno, Italy

Construction of lincomycin-induced expression system of cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*

Hideyuki Arimitsu, Kentaro Tsukamoto, Sadayuki Ochi, Keiko Sasaki and Takao Tsuji

43rd U.S.-Japan Cholera & Other bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting in Fukuoka.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金
社会保障国際協力推進研究事業（国際医学協力研究事業）分担研究報告書

Campylobacter jejuni に対する薬剤感受性調査とカルバペネム系抗菌薬の阻害作用

研究分担者 山本 達男 新潟大学大学院教授

研究要旨

Campylobacter jejuni はグラム陰性のらせん菌で、鶏肉の消費に伴って増加してきた食中毒の主要な起因菌である。本研究では過去 1 1 年間にわが国で分離された C. jejuni 85 株について 35 薬剤に対する感受性を調査した。薬剤耐性はキノロン系薬で 58%、テトラサイクリン系薬で 22% であった。マクロライド系薬では耐性は確認できなかった。一方、感受性が高い抗菌薬ではカルバペネム系薬が最も優れていた（例：イミペネムの場合 MIC₉₀, 0.13 µg/ml；メロペネムの場合 MIC₉₀, 0.03 µg/ml）。β-ラクタマーゼ阻害薬のクラバン酸（MIC₉₀, 2 µg/ml）とフラゾリドン（MIC₉₀, 0.5 µg/ml）も比較的良好な抗菌作用を示した。イミペネムとメロペネムはペニシリン結合蛋白（PBP）への結合を介して阻害作用を現すと考えられるが、誘導する形態変化は異なっていて、イミペネムでは球状菌、メロペネムでは紡錘状のらせん菌であった。C. jejuni は極めて高い運動性を示し、遊走速度は >100 µm/s であったが、カルバペネム系薬はこのような運動性に対しても強い阻害作用を示した。

A. 研究目的

Campylobacter jejuni はカンピロバクター属の中で最も代表的な菌種で、腸管粘膜に定着し、発熱を伴った下痢症、菌血症、そして Guillan-Barré syndrome (GBS) と関連する。近年の鶏肉消費の増加に伴って海外の多くの国と同様にわが国でも主要な食中毒起因菌となった。また、欧米ではキノロン系抗菌薬に対する耐性が顕著化し、保健衛生上の問題となっている。本研究では、わが国で過去十年間に分離された C. jejuni について薬剤感受性試験を行い、薬剤耐性化動向を把握すると同時に、最も感受性の高い抗菌薬を探索した。また、作用の高い抗菌薬についてはその作用メカニズムを解析した。

B. 研究方法

1) 菌株

1996 年から 2006 年にかけて新潟、東京、千葉で分離された下痢症患者 44 株、ギランバレー症候群患者 7 株、プロイラー及び鶏肉 34 株、計 85 株の C. jejuni を用いた。

2) 薬剤感受性試験

米国 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の寒天平板希釈で行い、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。培養は、微好気環境下で 37°C、48 時間行った。ブレイクポイントは、CLSI 及び米国 National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) に従った。使用した 33 薬剤は、製薬会社等から供与された薬剤を用いた。

3) 電子顕微鏡解析

C. jejuni を plastic coverslips 及び HEP-2 cell に粘着・感染させ、グルタルアルデヒドとオスミウム酸で固定し、脱水後、臨界点乾燥を行い、金属蒸着しサンプルとした。サンプルは走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。

4) 運動性解析

10%血清 (Fatal bovine serum) ブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地で培養し、運動解析装置で解析を行った。

C. 研究結果

1) 薬剤感受性試験

C. jejuni 85 株の 35 薬剤に対する感受性成績を Table 1 にまとめて示した。薬剤耐性はキノロン系薬で最も多く、ナリジクス酸で 56.5%、ノルフロキサシンで 55.3%であった。エンロフロキサシンでは 55.3%であった。テトラサイクリン系薬への耐性がこれに続き、テトラサイクリンとミノサイクリンで 22.4%、ドキシサイクリンで 20.0%であった。マクロライド系薬では耐性は確認できなかった。なお、モノパクタム系薬と ST 合剤では 100%耐性であった。

一方、感受性が高い抗菌薬ではカルバペネム系薬が最も優れていて、イミペネムの場合は MIC₉₀ 0.13 µg/ml で、メロペネムの場合は MIC₉₀ 0.03 µg/ml であった。β-ラクタマーゼ阻害薬のクラバン酸 (MIC₉₀ 2 µg/ml) とフラゾリドン (MIC₉₀ 0.5 µg/ml) でも比較的良好な抗菌作用が認められた。

2) カルバペネム系薬の作用メカニズム

イミペネムとメロペネムはペニシリン結合蛋白 (PBP) への結合を介して殺菌作用

を現すと考えられるが、両薬剤によって誘導される *C. jejuni* の形態変化は著しく異なっていて、イミペネムでは球状菌が、メロペネムでは紡錘状のらせん菌が誘導された (Fig. 1)。

3) 運動生の特徴

C. jejuni は極めて高い運動性を示し、37°C での遊走速度は >100 µm/s であった。なお室温 (20°C) では全く運動せず、極めて厳密な温度依存性を示した。また、カルバペネム系薬はこのような運動性に対して強い阻害作用を示した。

D. 考察

欧米では *C. jejuni* のキノロン耐性が大きな問題となっている。本研究でもキノロン耐性は 55%前後で確認された。テトラサイクリン耐性がこれに続き約 20%であった。なお、治療薬として推奨されているマクロライド系薬に対する耐性は確認されなかった。従って、わが国ではマクロライドによる治療に大きな問題は存在しない。

なお、本研究でカルバペネム系薬が極めて強い抗菌作用を示すことを明らかにした。カルバペネム系薬の *C. jejuni* に対する作用は PBP 阻害と考えられるが、同じカルバペネム系薬のイミペネムとメロペネムでは全く異なった *C. jejuni* 形態を誘導した。イミペネムでは球状菌、メロペネムでは紡錘状のらせん菌であった。この差異は、イミペネムとメロペネムの PBP タンパク群に対する結合能の差異に基づくと考えて、現在さらに研究中である。なお、*C. jejuni* は容易にコッコイド化することが知られている病原菌で、自然環境下ではコッコイドで存在しているとも考えられている。今回イミペ

ネムによって誘導された球状菌はらせん菌と同様に2本の鞭毛を持っていた。コッコイド化のメカニズムについてこのような観点からさらに研究を進めている。

C. jejuni はβ-ラクタマーゼ阻害薬のクラブラン酸 (MIC₉₀, 2 μg/ml) とフラゾリドン (MIC₉₀, 0.5 μg/ml) に比較的良好な感受性を示した。

C. jejuni は、コレラ菌やヘリコバクター・ピロリよりも高い運動能力を示し、遊走速度は>100 μm/sであった。C. jejuni の運動性は感染に必須であると考えられる。今後さらに運動性メカニズムを解明し、阻害薬を探索する予定である。このような阻害薬の中に新しい概念のC. jejuni 治療薬が見いだされる可能性がある。

E. 結論

(1) わが国で過去十年間に分離されたC. jejuni の薬剤感受性調査を行った。薬剤耐性はキノロン系薬テトラサイクリン系薬で見いだされた。マクロライド系薬では耐性は見いだされなかった。

(2) C. jejuni はカルバペネム系薬に最も高い感受性を示した。カルバペネム系薬の中にはコッコイドや紡錘形などの顕著な形態変化を誘導し、その上で殺菌作用を示した。

(3) C. jejuni はコレラ菌やヘリコバクター・ピロリよりも高い運動能力を示した。この運動性は厳密に温度によって制御されていた。

F. 健康危険情報

キノロン系薬を中心に薬剤耐性が顕著である。今後もC. jejuni の薬剤感受性動向に

注意する必要がある。

G. 研究発表

(1) 矢部 静、樋口 渉、レワ イワン、高野智洋、西山晃史、山本達男：カンピロバクター・ジェジュニの運動性と形態変化、第1回日本カンピロバクター研究会総会、2008 (12月、東京)

(2) Yabe S, Higuchi W, Takano T, Yamamoto T : Inhibitory effects of carbapenems against Campylobacter jejuni, 43rd US-Japan Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (Fukuoka), 2008 (11月)

(3) 矢部 静、樋口 渉、高野智洋、山本達男 : シタフロキサシン、β-ラクタマーゼ阻害薬、カルバペネムを含む抗菌薬の抗 Campylobacter jejuni 作用。第81回日本細菌学会総会、2008 (3月、京都)

(4) Yabe S, Takano T, Higuchi W, Isobe H, Yamamoto T : In Vitro Susceptibility of Campylobacter jejuni to Antimicrobial Agents Including Sitafloxacin, β-Lactamase Inhibitors and Carbapenems. 14th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (Rotterdam, Netherlands), 2007 (9月)

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし