

表1 ウエルシュ菌のニワトリひき肉への接種回収実験-1

接種菌株	接種菌数 (総cfu)	PCR(陽性数/検査数)	
		前培養法	
		BPW	TGC
—		0/3	0/3
W4243	61	3/3	2/3
	612	3/3	2/3
W5837	50	3/3	3/3
	800	3/3	3/3
W6205	996	3/3	3/3
	9960	3/3	3/3

表1 ウエルシュ菌のニワトリひき肉への接種回収実験-2

接種菌株	接種菌数 (総cfu)	PCR(陽性数/検査数)	
		前培養法	
		BPW	TGC
—		0/3	0/3
W4243	0.38	1/3	0/3
	3.8	3/3	0/3
W5837	3.8	3/3	0/3
	37	3/3	0/3
W6205	0.5	2/3	0/3
	5	3/3	0/3

表2 ウエルシュ菌のアサリへの接種回収実験

接種菌株	接種菌数 (総cfu)	PCR(陽性数/検査数)	
		前培養法	
		BPW	TGC
—	—	3/3	0/3
W4243	2.8	3/3	0/3
	15	3/3	2/3
W5837	44.8	3/3	0/3
	448	3/3	2/3
W6205	11	3/3	1/3
	87.6	3/3	1/3

表3 ウエルシュ菌のブロッコリーへの接種回収実験

接種菌株	接種菌数 (総cfu)	PCR(陽性数/検査数)	
		前培養法	
		BPW	TGC
—	—	0/3	0/3
W4243	6	0/3	0/3
	72	2/3	1/3
W5837	49	2/3	0/3
	488	0/3	2/3
W6205	32	0/3	0/3
	324	2/3	2/3

表4 ウエルシュ菌の水菜への接種回収実験

接種菌株	接種菌数 (総cfu)	PCR(陽性数/検査数)	
		前培養法	
		BPW	TGC
—		0/3	0/3
W4243	65.2	0/3	2/3
	652	0/3	3/3
W5837	35.8	0/3	0/3
	358	3/3	3/3
W6205	14.8	0/3	1/3
	148	3/3	3/3

# 分 担 研 究 報 告 書

食品中のウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子新原理検出の

基礎的検討、毒素ならびに菌から考える

ウェルシュ菌食中毒発現機構

山本 茂貴

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

分担研究報告書

ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子の新原理検出法の基礎的検討、毒素ならびに菌から考えるウエルシュ菌食中毒発現機構

分担研究者 山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部長

協力研究者 堀口 安彦 大阪大学微生物病研究所 分子細菌毒素学領域

協力研究者 山本 茂一、宇治家 武史、林 司

株式会社カイノス研究所 開発部

協力研究者 三宅 眞実、星 英之

大阪府立大学大学院 応用生命科学研究科

要旨： ウエルシュ菌食中毒の原因食品中には、ウエルシュ菌の生菌が多く含まれることが一般に認められており、食品中のエンテロトキシン遺伝子を検出すれば、その後のウエルシュ菌食中毒発生を防止できる可能性がある。遺伝子の相補性を利用する核酸クロマト法を検討した。従来の着色ラテックスを用いた手法では、エンテロトキシン RNA が  $3 \times 10^9$  コピー必要だった。ラテックスに酵素を吸着させた改良核酸クロマトでは、 $1 \times 10^6$  コピーという少量の RNA で検出が確認され、大幅な感度の向上があった。腸管腔内でのウエルシュ菌生菌の動態を調べる実験モデルを構築した。ヒト由来腸管上皮細胞 Caco-2 をトランスウェル内で培養し、ウエルシュ菌生菌を接種し、その増殖を促進する因子を検討した。その結果、細胞の増殖に伴う代謝によって、培地の酸化還元電位の低下、および菌体あるいは菌体からの分泌物で障害を受けた細胞成分が、生菌増殖の刺激物となり、ウエルシュ菌の増殖を刺激している事が示唆された。食中毒の発生機序を考える際、エンテロトキシンの行動・動態が重要となる。エンテロトキシンは腸管上皮細胞膜に分布するクローディンタンパク質を認識する際、クローディンの第 2 ループ中で塩基性アミノ酸が配列する部分と、エンテロトキシンの酸性の溝の部分で結合し、両者の結合は静電的なものであることが示唆された。

## A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は生体内毒素型食中毒に分類されている。本食中毒発生の機序として、1) 食品内での大量の生菌の存在、2) 食品を通じて取り込まれた生菌の胃通過、3) 生菌の腸管内での増殖、4) 芽胞とエンテロトキシンの産生、5) 毒素の腸管上皮細胞への攻撃、が認識されており、最終的にエンテロトキシンによる下痢誘発に至るものと理解されている<sup>1)</sup>。つまり本食中毒は、非常に複雑な機序を経て発生する。このことは多方面からの分析調査解析がウエルシュ菌食中毒の予防には必要であることを示している。

ウエルシュ菌は、土壌や動物の腸管内に棲むグラム陽性嫌気性芽胞形成性の桿菌で、種々の毒素を産生する。そのうち、食中毒に関与するのは、エンテロトキシン産生性のものに限られ、したがって、エンテロトキシン遺伝子保有のウエルシュ菌生菌および芽胞が食中毒予防の対象となる。ウエルシュ菌の食品への汚染の機会が多いが、毒素遺伝子を保有しているウエルシュ菌は非常に少ない<sup>2)</sup>。この事実は、ウエルシュ菌食中毒が事件数としては多いものでないことを支持する。一方、事件あたりの患者数が多いという現象は、ウエルシュ菌食中毒の原因食および原因食喫食時の食品の状況が説明する。ウエルシュ菌の原因食には、弁当、惣菜、給食、仕出し食品があげられる。いずれも一度に大量に製造されるもので、家庭で調製されるものとは異なる。具体的なメニューとしては、カレー、シチューなどの煮込み料理が多い。

何十人分を調整する大きな調理機器が用いられて製造されている。調理から喫食までに長時間（多くは室温で翌日まで）放置されている場合が多い<sup>1)</sup>。現在までに集積された知見からは、原因食品中にはグラムあたり  $10^6$ cfu 以上のウエルシュ菌生菌が検出されることが、原因食品が示すウエルシュ菌食中毒発生の条件になっている。非常に大量のウエルシュ菌生菌が取り込まれ、その大半は死滅するものの、胃を通過して腸に達した生菌が増殖し、その後芽胞が形成される。その際、下痢原性毒素であるエンテロトキシンが合成され、腸管上皮細胞を攻撃し、下痢を引き起こす機構が考えられている。エンテロトキシンはアミノ酸 319 個からなる、分子量が 35 kDa のタンパク質で、糖や脂質の修飾を受けていない。上述したように、エンテロトキシンは芽胞形成の際に合成されることがわかっている。エンテロトキシンは、腸管上皮細胞のタイトジャンクションを構成するタンパク質クロードインを受容体として結合し<sup>3-6)</sup>、5 から 6 分子が集合したオリゴマーとなって細胞膜に強く結合する。細胞膜に埋まる状態になる。その際、集合したエンテロトキシン分子の中央に小さな穴が形成される。小孔、ポア、あるいはチャネルと称される構造物で、小孔部分から、細胞質内の電解質が水分子と共に漏出する。これが下痢になり、症状が誘発される状態になる<sup>1)</sup>。したがって、ウエルシュ菌食中毒は、まず大量の生菌が必要であること、菌の感染、腸管内増殖が起こること、芽胞形成がありエンテロトキシン産生が

腸管内で起こることが発生条件となる。以上から、ウエルシュ菌が生体内毒素型の食中毒を起こすことがわかる。

本分担研究においては、平成21年度は次の3点について検討した。上述したように、ウエルシュ菌食中毒の発生の基本的条件として、喫食した食品中に多量のエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が存在することがあげられている。大量の生菌の存在は、大量のエンテロトキシン遺伝子の存在を示す。このことから、喫食直前に食品中からウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子を検出すれば、ウエルシュ菌食中毒を予防できる可能性が考えられる。平成20年度は、検査対象に対する特異性を、核酸の2本鎖間におけるハイブリダイゼーションによって担保されている核酸クロマト法について、基礎的な面を検討した。その結果、現在確立している方法に、単純にウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子を検出するには、感度が悪い事を明らかにした。本年度はその感度向上を目指した。第2の目的は、腸管腔内での、ウエルシュ菌生菌がどのような増殖様式を示すのかを検討できる実験システムを構築することにある。発症機序からは、腸管腔内でウエルシュ菌生菌が大量に増殖するとされているのであるが、その実態を検討した研究はない。菌の増殖後、芽胞形成が起こり、同時にエンテロトキシンが産生されるはずであるが、腸管上皮細胞との生菌や芽胞の相互作用は全く分かっていない。腸管上皮培養細胞をもちいての実験モデル作製を検討した。第3の目的は、エンテロトキ

シンの作用機構の解析を昨年度に引き続き行うことにある。エンテロトキシン分子と、腸管上皮細胞に分布する毒素受容体であるクローディンとの相互反応を、アミノ酸レベル、立体構造レベルで解析することを目的とする。その相互作用がどのような生化学的な親和力で形成されているのか検討した。

## B. 実験方法

1 核酸クロマト<sup>7)</sup>に用いる検定用の核酸  
公共データベースから、ウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子の塩基配列を入手し、その部分RNAを合成した。

エンテロトキシンの塩基配列からサンドイッチハイブリダイゼーションに適した部分2カ所を検索した。当該部分は約15塩基対くらいで、エンテロトキシン遺伝子内部の、さらには各種の細菌が保有しない配列を探索し、決定した。当該部分のDNAを合成し、一方はクロマトストリップに固着させ、捕捉用オリゴDNAとして用いた。もう一方は、着色ラテックス粒子に結合させ、検出用オリゴDNAとして用いた。

## 2 核酸クロマト

エンテロトキシンRNA溶液をクロマトストリップに添加後、着色ラテックス結合検出用オリゴDNAを反応させ、目視確認できるバンドの有無を検討した。

酵素標識検出用オリゴDNAを用いた場合、反応後クロマトストリップを洗浄し、ウエスタンブロット法で用いられる発色



基質を添加し、サンドイッチハイブリダイゼーションが起こっているか否かを、発色バンドの出現の有無で検討した。

従来法である着色ラテックスを用いてのハイブリダイゼーション反応系を構築した(図1)。以上の従来法に加え、ペルオキシダーゼを結合させた酵素標識ラテックスに検出用オリゴDNAを標識し、核酸クロマトを検討した(図2)。

### 3 トランスウェルを用いてのウエルシュ菌腸管内増殖実験モデル

#### 1. Caco-2 細胞の培養と上皮間電気抵抗値の測定

ヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞は、ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ MEM (DMEM) を用いて培養した。細胞はおよそ 80%コンフルエントに達することに継代した。

トランスウェル内側にあたるウェルに Caco-2 細胞を播種し、5 日間培養を行った。この間に Caco-2 細胞は腸管上皮細胞のもつ形態を示し始める。すなわち、メンブレンフィルターに接した基底膜側と反対側の管腔側に分化する。細胞間にはタイトジャンクションが構成され、物質の移動が制限される。このため、基底膜側と管腔側を通电した場合、電気抵抗が発生する。その抵抗値を上皮間電気抵抗値 (TER) といい、タイトジャンクションの健全性、換言すれば細胞間のバリア機能を完全性の指標となる。バリア機能が障害を受けた場合、電気抵抗値が減弱する (図○)。

#### 2. ウエルシュ菌の増殖の測定

FCS および細胞の、ウエルシュ菌増殖への影響を検討した。6 ウェルプレートの 1 ウェル当り 3 ml の DMEM あるいは 20% FCS 含有 DMEM を分注後、ウエルシュ菌の一晩培養液、60  $\mu$ l を添加した。37°C 5% CO<sub>2</sub>、または嫌気ガスパック中で経時的に DMEM の 600 nm による濁度を測定した。Caco-2 細胞を播種し、同様の実験を行った。

ウエルシュ菌の増殖に、細胞への菌の接着が必要か否か、検討した。6 ウェルプレートのウェル内に細胞を播種し、コンフルエントの状態まで培養した。その中に、トランスウェルを設置し、ウェル内部にウエルシュ菌生菌を接種した。摂取量は上記と同様である。プレートを 37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内に設置し、培養、経時的に培地の濁度を測定し、ウエルシュ菌の増殖の程度を計測した。

#### 3. 細胞障害性の測定

障害を受けた細胞から遊離する Lactate dehydrogenase (LDH) を、LDH-Cytotoxic test Wako (和光純薬) を用いて測定し、細胞の障害性の指標とした。

### 4 ウエルシュ菌エンテロトキシンと変異クローディン受容体と反応解析

#### 1. HEK293 細胞での発現のための pcDNA3 由来プラスミド

ヒト (hu)Cldn1、huCldn4、サル (mk)Cldn4、Cldn4-1(A)、Cldn4-1-1(A)

の cDNA は全て C 末端で FLAG ペプチドで標識し、pMEpyori18Sf プラスミドに挿入した。これらの cDNA は XhoI と XbaI での消化後切り出し、pcDNA3 (Invitrogen) 中に挿入した。pcDNA3-Cldn1-4-1(C)は次のように構築した。鋳型として pcDNA3-huCldn1、上流断片用のプライマーの組み合わせを T7 と 141C-R、および下流断片用のプライマーの組み合わせを SP6 と 141C-F として Cldn1-4-1(C)の上流および下流の遺伝子断片を PCR で増幅した。2つの断片は T7、SP6 と共にさらに PCR を行った。DNA 断片は pcDNA3 の XhoI-XbaI 間に挿入した。pcDNA3-Cldn1-4-1(D)は同様の方法で用意した。pcDNA3-Cldn4HA の為、鋳型として pcDNA3-mkCldn4、HpaI と SacII の両側の 4aHS と T7 の組み合わせ、および SacII と SP6 を含んでいる S-4b の組み合わせで 2 つの断片を PCR で増幅した。SacII での消化後、2 つの断片を連結し、それから pcDNA3 の XhoI-XbaI 間に挿入した。

合成オリゴヌクレオチド(HA-F と HA-R)をアニールさせた。HA 標識(VNYPYDVPDYAENLYFQGAA)をコードしている断片を Cldn4 遺伝子の対応する座位へ挿入した。他の pcDNA3 由来プラスミドは pcDNA3-Cldn4-1(B) と pcDNA3-Cldn4-1(C) のために pcDNA3-Cldn4-1(A) を、pcDNA3-Cldn1-4-1(B) のために pcDNA3-Cldn1-4-1(C) を鋳型に QuikChange site-directed mutagenesis

kit(Stratagene, La Jolla CA)で作成した。

## 2. L929 細胞での発現のための pMEneo 由来プラスミド

huCldn4 の cDNA を PCR により増幅し、pEF6/V5-His TOPO TA(Invitrogen)に挿入した。Cldn4 遺伝子は SpeI と XbaI で消化により切り出し、pMEneo の対応する座位へ挿入した(18)。V5 標識遺伝子が Cldn4 遺伝子の下流に挿入されるように、pEF6/V5-His TOPO TA の EcoRV-PmeI 断片は pMEneo 由来ベクターの EcoRV 部位へ挿入した。得られた DNA を pMEneo-huCldn4 と名付けた。huCldn5 と huCldn10 の cDNA は National Institutes of Health Mammalian Gene Collection(huCldn5 と huCldn10 の Image ID はそれぞれ 5242567 and 4246806)から得、マウス(ms)Cldn7 の cDNA は RIKEN Mouse Genome Encyclopedia DNA Book™(DNA ID 0610043B04,DNAFORM)から得た。DNA 断片は huCldn5、huCldn10 と msCldn7 の cDNA と PCR を行い増幅し、pEF6/V5-His TOPO TA にクローニングした。得られたプラスミドは pEF6-huCldn5、pEF6-huCldn10、pEF6-msCldn7 と名付けた。これらのクローニングをコードしている DNA 断片はそれぞれのプラスミドから SpeI と EcoRV で消化によって切り出され、対応する領域内の pMEneo-huCldn4 の Cldn4 遺伝子と置換した。pMEneo-huCldn4-5-4 は以下のようにして構築した。鋳型として

pEF6-huCldn5、プライマーとして 454-R2 と T7 および鋳型として pEF6-huCldn4、プライマーとして 454-F2 と BGHrv を用いて 2 つの独立した PCR を行った。得られた 2 つの DNA 断片は鋳型として T7 と BGHrv と PCR に用い、huCldn5(1 ~ 160 番のアミノ酸)と huCldn4(161~209 番のアミノ酸)のキメラな DNA 断片が得られた。このフラグメントは鋳型として、プライマー 454-F1 と BGHrv と PCR に用い、別の PCR を鋳型を pEF6-huCldn4、プライマーを 454-R1 と T7 で行った。続いて、2 つの DNA 断片はプライマーを T7 と BGHrv にして PCR にかけた。Cldn4-5-4 をコードしている DNA 断片は上記のようにして pMEneo-huCldn4 の SpeI-EcoRV 座位に挿入された。pMEneo-cldn5-4-5、pMEneo-Cldn7-5-7、pMEneo-Cldn5-7-5 は同様の方法で用意した。他の pMEneo 由来プラスミドは pMEneo-Cldn4FYAA と pMEneo-Cldn4NRDY の鋳型として pMEneo-huCldn4、pMEneo-Cldn5DYNR の鋳型として pMEneo-huCldn5 で QuikChange site-directed mutagenesis kit により作成した。

### 3. 変異クローディンとウエルシュ菌エンテロトキシンとの相互作用解析のための細胞培養

HEK293 細胞と L929 細胞は 10% 牛胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's メディウムで 37°C、5%CO<sub>2</sub> 中で培養した。安定して Cldn を発現している

細胞株または Cldn 変異株は以下のようにして確立した。24-well プレートで培養した HEK293 または L929 細胞はそれぞれ 2  $\mu$ g/well の pMEneo 由来または pcDNA3 由来プラスミドと Lipofectamine 2000 (Invitrogen)の助けで変異させた。1 mg/ml の G418 に抵抗性のクローンを形質転換体として選択し、500  $\mu$ g/ml の G418 を含む Dulbecco's modified Eagle's メディウムで維持した。選択したクローンによる Cldn あるいは Cldn 変異株は実験に使用する前に HEK293 細胞で発現している Cldn には抗 FLAG 抗体で、L929 細胞で発現している Cldn には抗 V5 抗体で Western blotting 法により確認した。msCldn7 を除く msCldn 発現 L929 細胞は月田博士(京都大学)により提供された。これらの Cldn は C 末端において FLAG ペプチドで標識されているため、その発現レベルは抗 FLAG 抗体を用いての Western blotting 法で確認した。

### 4. ウエルシュ菌エンテロトキシンとその C 末端フラグメント

pET16bCPE あるいは pETH10PER(10)はそれぞれ His 標識 CPE 遺伝子あるいは His 標識 C-CPE 遺伝子を含んでおり、大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 株 (Stratagene)をそれらのプラスミドで形質転換した。エンテロトキシンおよびその C 末端フラグメントは、1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside を LB 培地に添加して誘導した。細菌体は超音波処理で

破壊し、0.3M NaCl と 10mM イミダゾールを含む 50mM リン酸緩衝液(pH 8.0)で懸濁した。遠心上清を His ニッケル親和性ゲル(Sigma)カラムに掛け、発現させた毒素を同じ緩衝液に 10~500mM イミダゾール勾配によって溶出し精製した。

#### 5. 細胞に発現したクローディングタンパク質の存在確認のための抗体

抗 V5 モノクローナル抗体と Alexa488 標識抗マウスモノクローナル抗体は Invitrogen から購入した。抗 HA モノクローナル抗体(HA.11)は Covance から購入した。抗 FLAG M2 モノクローナル抗体は Sigma から購入した。抗  $\beta$ -アクチンポリクローナル抗体は Imgenex から、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギポリクローナル抗体は Jackson(West Grove, PA)から、ペルオキシダーゼ抱合抗マウスポリクローナル抗体は ICN Pharmaceuticals から購入した。

#### 6. ウェルシュ菌エンテロトキシンの放射性ヨウ素標識と結合様式の解析

エンテロトキシンあるいはその C 末端フラグメントの放射性ヨウ素標識と、Cldn 発現細胞( $10^5$ cell/assay)の結合分析は既報の方法に従って行った(10)。 $^{125}$ I 標識エンテロトキシンの放射活性は 42~144 MBq/mg タンパク質となった。

変異に生じさせたペプチドの等電点は EMBOSS software package の PEPSTATS program で計算した(19)。C 末端フラグメントの画像は PyMOL と共に構造データ(protein

Data Bank code 2QUO)から描いた。同フラグメントの表面電荷は Adaptive Poisson-Boltzmann Solver により計算した。

#### C. 結果と考察

##### 1 核酸クロマト法のエンテロトキシン遺伝子の検出感度

RNA を検出するときの感度について検討した。データベースからエンテロトキシンの塩基配列を取得し、その配列を RNA として合成した。従来法である着色ラテックスを用いてのハイブリダイゼーション反応系を構築した(図1)。合成エンテロトキシン RNA のコピー数を調製し、構築した核酸クロマトストリップに適応した。その結果、反応を目視確認できるには  $3 \times 10^9$  コピーの合成 RNA が必要だった(図2)。

次に、ラテックスペルオキシダーゼを標識し、核酸のハイブリダイゼーション後に、ハイブリダイズしたラテックスの酵素を発色させるシステムを構築した(図3)。合成 RNA を変量にて反応させたところ、 $1 \times 10^6$  コピーのエンテロトキシン RNA で陽性反応が目視確認された(図4)。検出可能なコピー数を従来法と比較すると、酵素標識ラテックスの利用で、3,000 倍の感度向上があった計算になる。

##### 2 ウェルシュ菌生菌と腸管上皮細胞感の相互作用を検討する実験モデルの構築と、ウェルシュ菌増殖に与える各種の因子の解析

### 1. トランスウェルにおける Caco-2 細胞の上皮間電気抵抗値と細胞障害性に与えるウエルシュ菌生菌の影響

ガス壊疽由来の JCM1290 株、土壌由来の CPSK01、37-1 株、および 37-2 株を使用した。各々の菌株培養液を、Caco-2 細胞を増殖させたトランスウェル内に接種し、経時的に TER と細胞障害性を測定した。コントロールとしてのメディウムおよび 37-2 株を除き、菌接種 4 時間後には TER 値が接種直前の 20 から 30%に、8 時間後には約 10%にまで低下した (図 6)。LDH を指標とした細胞障害の割合は、4 時間後では 5 から 15%と低く、細胞は正常を保っていたが、6 時間後には約 50%にまで増加し、細胞の障害が明瞭となった (図 6)。JCM1290 株、CPSK01 株、および 37-1 株を接種することにより、細胞間バリアが時間経過とともに破壊されることが確認された。TER 値の低下と細胞障害率の上昇が並行していることから、ウエルシュ菌によって細胞が障害され、その結果細胞間バリアが破壊されるものと考えられた。

### 2. ウエルシュ菌増殖へ与える嫌気性状態、FCS および Caco-2 細胞の影響

上記の実験条件で、ウエルシュ菌の増殖を測定した。FCS を含んだ DMEM、含有しない DMEM、および嫌気性状態、あるいは 5%CO<sub>2</sub> 状態が、接種ウエルシュ菌与える影響を調べた。その結果、Caco-2 細胞が存在しない場合、FCS が存在し、かつ、嫌気状態の時のみにウエルシュ菌の経時的増殖が確認された (図 7)。

さらに細胞の有無についても検討した。ウェル中に細胞が増殖しており、その培養液中にウエルシュ菌を接種した場合、5% CO<sub>2</sub> の状態においても、立ち上がりは遅いものの、嫌気状態と同様のウエルシュ菌増殖が誘導された (図 8)。このときのウエルシュ菌増殖には FCS は必要ではなく、嫌気状態、および、5%CO<sub>2</sub> と細胞との共存状態で、菌増殖の条件が成立していた。この実験事実は、ウエルシュ菌の腸管内増殖には血清のような高度な栄養物が必要なのではなく、嫌気性状態を成立させればよいこと、さらに、細胞の存在がウエルシュ菌増殖に寄与することを示唆している。

### 3. ウエルシュ菌増殖と菌体と細胞の存在状態に関する検討

トランスウェル内に Caco-2 細胞を培養し、外液中にウエルシュ菌を接種した。その後 5%CO<sub>2</sub> 状態で培養したところ、ウエルシュ菌の増殖が認められた。上記の実験で、細胞の存在がウエルシュ菌の増殖を促進させている結果を得たが、その増殖刺激には菌体と細胞との接触は必要ではないことが示された。従って、細胞由来の可溶性成分が、ウエルシュ菌増殖を刺激していると示唆された。

ウエルシュ菌は生菌の状態では腸管に達して増殖し、その後芽胞形成、エンテロトキシン産生、エンテロトキシンの腸管上皮細胞への侵襲、下痢症状発現という時間推移をとって食中毒を引き起こすとされている。この時間推移のなかで、腸管腔内の菌の挙動を正確に把握する実験モデル

は構築されておらず、患者便中の菌、芽胞、およびエンテロトキシン定量結果からの推察から、ウエルシュ菌食中毒発生機序が語られていた。今回、腸管内でのウエルシュ菌生菌の増殖の動向を検討できる、実験モデルを作製した。トランスウェルに播種されたヒト結腸由来 Caco-2 細胞は、生体内の腸管上皮細胞と同様に細胞間結合をし、タイトジャンクションを形成、管腔側と基底膜側に機能が分化する。細胞間バリアが破壊された場合の指標である上皮間電気抵抗値、細胞障害性、およびウエルシュ菌生菌数を測定することにより、以下に記述するウエルシュ菌の腸管腔内での増殖メカニズムが考えられる (図9)。腸管腔内の酸化還元電位は、腸管上皮細胞の代謝活動によって、低下している。すなわち、ウエルシュ菌にとって増殖の都合の良い嫌気状態となっている。腸管腔内に到達したウエルシュ菌は増殖を始めるが、このとき、細胞が障害を受けていると、細胞から可溶性の物質が放出される。この物質がウエルシュ菌の増殖を刺激し、大量のウエルシュ菌を腸管内に存在させ、その後、芽胞形成、エンテロトキシン産生につながってゆく。初期に増殖したウエルシュ菌から、細胞を障害する病原物質が放出されている可能性が考えられる。障害を受けた細胞から放出される物質 (図では栄養物と表示した) が何かは不明である。今回開発したトランスウェルを用いてのウエルシュ菌と腸管上皮細胞との関係を検討できる実験モデルは、ウエルシュ菌食中毒の発生メカニズムを解析するうえで、有効なもの

なると考えられる。

### 3 ウエルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構の解析

以前の報告で、エンテロトキシンは感受性クローディンの第2ループを認識することを明らかにした(16)。*in situ* でクローディンの第1細胞外ループはエンテロトキシンとの相互作用に関係があるかは不明のままである。第一段階として第1細胞外ループに HA 標識を持つ組換え Cldn4(Cldn4HA)を構築した。我々は安定して Cldn4HA を発現している HEK293 細胞を確立し、レセプター結合ドメインであるエンテロトキシン C 末端フラグメントの結合を調べた。フローサイトメトリーによる解析は、ビオチン化 C 末端フラグメントはクローディン 4HA に結合した。これらの結果はクローディンの第1ループはエンテロトキシンとの相互作用に関係していないことを意味し、以前の観察結果を裏付けている。

次にクローディン第2ループに注目した。様々な形状のキメラ状態の第2ループを持つクローディンを発現しているエンテロトキシン非感受性 HEK293 細胞を用意し、それらのエンテロトキシン感受性を調べた。細胞膜上にクローディンが発現していることは確かである。結果、典型的なエンテロトキシン非感受性クローディンと考えられていたクローディン1が実際には高濃度の毒素と反応することを発見した。そのため我々は、細胞毒性分析の結果からエンテロトキシンに対するキ

メラクローディン発現細胞の  $EC_{50}$  を計算し、それらの感受性を比較した。結果として、クローディンは高感受性クラス ( $EC_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$ )、低感受性クラス ( $1 \leq EC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ )、非感受性クラス ( $EC_{50} \geq 30 \mu\text{g/ml}$ ) に分類した (表 1)。これらの基準によると、クローディン 1 は非感受性ではなく低感受性として分類される。キメラクローディン間では、Cldn4-1(A) が非感受性である一方で、クローディン 4-1(B) はエンテロトキシンに高感受性であった。クローディン 1-4-1(B) も高感受性であったが、クローディン 1-4-1(C) と (D) はクローディン 1 と同様に少し感受性であった。これらの結果はクローディン 4 の 149 番アスパラギンから 160 番メチオニンの領域がエンテロトキシンの感受性を決定していることを示唆している。我々はこの領域をエンテロトキシン感受性関連領域 (エンテロトキシン-SR) と名付けた。細胞膜に十分発現しているのにクローディン 4-1(A) がエンテロトキシンに非感受性となった理由は不明であった。このキメラ変異は第 2 ループ周辺と膜貫通領域下流の構造に影響するかもしれない。次にクローディン 4 のエンテロトキシン-SR が別のエンテロトキシン非感受性クローディン、クローディン 5 に変化するかを検討した (図 1 0) (9,10)。

HEK293 細胞は長期間の連続継代の後に、時としてエンテロトキシン感受性を得ることがわかったので、不適切と考え、HEK293 細胞の代わりに L929 細胞を以下の実験に用いた。クローディン 4 におけるエンテロトキシン-SR 対応領域の場所で、

クローディン 5 に挿入したキメラであるクローディン 5-4-5 を安定して発現する L929 細胞を樹立し、それらのエンテロトキシン感受性を調べた。クローディン 5-4-5 発現細胞はクローディン 4 発現細胞と同様にエンテロトキシン感受性を示した (図 1 0)。対照的にクローディン 4 のエンテロトキシン-SR をクローディン 5 の対応する領域に置換したとき、クローディン 4 は非感受性になった (図 1 0、クローディン 4-5-4)。クローディン 5 とエンテロトキシン感受性クローディン 7 の場合も同様だった。クローディン 7 のエンテロトキシン-SR とクローディン 5 の置換はエンテロトキシン非感受性となった (図 1 0)。一方で、クローディン 7 のエンテロトキシン-SR はクローディン 5 を感受性にする (図 1 0)。算出した  $EC_{50}$  から、クローディン 5-4-5 とクローディン 5-7-5 は高感受性として分類された (表 2)。 $^{125}\text{I}$  標識エンテロトキシンはクローディン 5 あるいはクローディン 4-5-4 発現細胞ではなくクローディン 4 あるいはクローディン 5-4-5 発現細胞に結合した (図 1 1)。これらの結果は様々なクローディンを発現している細胞のエンテロトキシン感受性はクローディンへのエンテロトキシンの結合で説明できることを示している。エンテロトキシンとのクローディン 4 およびクローディン 5-4-5 の  $Kd$  はそれぞれ  $4.42 \times 10^{-9}$  と  $1.91 \times 10^{-8} \text{M}$  だった。これらの値はエンテロトキシン感受性クローディンで推定された値に一致する (9,10,16,22)。 $^{125}\text{I}$  標識エンテロトキシン結合総量はクローディン 4 発現細

胞よりもクローディン5-4-5発現細胞で高かった。これはおそらく図10Bに示すように、前者は後者より多くのクローディンを発現していたためと考えされた。

クローディン分子上のエンテロトキシン-SRがエンテロトキシンレセプターとして働くために、鍵となる領域を特定する検討を行った。エンテロトキシン-SRのどの因子がエンテロトキシンによって認識されているかを理解するために、我々は2つの可能性を検討した。すなわち、クローディンはエンテロトキシンに結合するための固有の能力を有し、非感受性クローディンのエンテロトキシン-SRは否定する、あるいは、感受性クローディンのエンテロトキシン-SRは毒素と相互作用するための共通の特徴を有しているかもしれない、の2点である。最初の可能性について、クローディンの第2ループ内にある2つの共通する芳香族アミノ酸がエンテロトキシンのレセプター結合領域の芳香族アミノ酸に直接相互作用するということを提案している以前の報告に注目した(21)。FY(フェニールアラニン・チロシン)やFF(フェニールアラニン・フェニールアラニン)といった、これらの芳香族アミノ酸はクローディンのエンテロトキシン-SRのすぐ上流に位置しており(表2)、クローディンがタイトジャンクションを形成するために必要な相互結合反応に関係することが提案され(23)、それらはクローディン分子の外側に位置していることが示唆されている。この観察結果が正しいなら、クローディンファミリーのメンバーに共

通であるFYやFFはエンテロトキシンにクローディンの接触部分を与えることが可能であり、エンテロトキシン感受性クローディンのエンテロトキシン-SRは芳香族残基を通じてそれらの相互作用に関与する可能性がある。この問題に解答するため、クローディンのFY残基が、エンテロトキシンとの相互作用に関係があるかを調べた。147番フェニールアラニンと148番チロシンをアラニンに置換したクローディン4FYAAを発現しているL929細胞を樹立し、それらのエンテロトキシン感受性を調べた(図12)。クローディン4FYAAの細胞はクローディン4発現細胞と同程度の感受性を示した。さらに、エンテロトキシンはクローディン4発現細胞と同様にクローディン4FYAA発現細胞に結合した。これらの結果は最初の可能性を否定するものである。

次に感受性クローディンのエンテロトキシン-SRはエンテロトキシンと相互作用するための共通の特徴を持つという別の可能性を調べた。エンテロトキシン-SR内の共通配列あるいはエンテロトキシン感受性を決定しそうなモチーフを見出すことを試みた。この目的の為に、様々なクローディンを発現している細胞で細胞毒性分析を行い、それらを高感受性、低感受性、非感受性に分類し、エンテロトキシン-SRの配列を比較した(表2)。これらの結果から、クローディンは上述したエンテロトキシン感受性に基づく3つのクラスに分類できたが、それぞれのクラスのエンテロトキシン-SR内で共通配列やモチーフ



は明白ではなかった。

クローディンのエンテロトキシン-SRの当電点を計算したところ、高感受性のクローディンは比較的高い等電点を有し、低感受性あるいは非感受性クローディンのエンテロトキシン-SRの等電点はより低い値を示すことが分かった(表2)。エンテロトキシン-SRの等電点の差異はエンテロトキシン-SRの1番目と10番目のアミノ酸の違い、例えばクローディン4ではアスパラギンとアルギニンであることに対しクローディン5ではアスパラギンとチロシンに由来している。エンテロトキシン-SRの等電点と感受性の間の関係を探るため、派生的なクローディン4とクローディン5の遺伝子を構築した。派生的クローディン4、クローディン4<sup>NRDY</sup>はクローディン5と等しい等電点のエンテロトキシン-SRを持ち、派生的クローディン5、クローディン5<sup>DYNR</sup>はクローディン4と等しい等電点のエンテロトキシン-SRを持つようにエンテロトキシン-SRを変化させた(表2)。これらのクローディンはL929細胞膜上で発現しており、それぞれのエンテロトキシン感受性を調べた(図13)。予想通り、エンテロトキシン-SRの等電点を上昇させる変異はクローディン5を感受性にし、等電点を低下させるような変異はクローディン4を1/100以下の低感受性にした(図13)。クローディン4とクローディン5はどちらも低感受性グループに分類されるが、クローディン5<sup>DYNR</sup>はクローディン4<sup>NRDY</sup>の10倍以上の感受性を示した(表2)。クローディン5<sup>DYNR</sup>はエンテロ

トキシンレセプターとして働くが、クローディン4<sup>NRDY</sup>は毒素に結合する能力が減少した。クローディン-エンテロトキシン分子間の相互作用の強さ(イオン強度)を調べるために、様々なNaCl濃度下でクローディン4発現細胞とC-エンテロトキシンの結合分析を行った。NaCl濃度を0.14から1.0Mまで上昇させたとき、細胞へのエンテロトキシンC末端フラグメントの結合がおよそ40%まで減少した(データ未掲載)。この結果は、クローディン-エンテロトキシン結合は、生理的条件下では強く結合している事を示している。また、その結合力(イオン強度)は比較的に強いことを示唆している。

以上の実験結果から、エンテロトキシンとその受容体であるクローディンとの相互認識反応は、それぞれのアミノ酸由来の静電的結合で成り立っていること、その実態は、クローディン分子の細胞外第2ループの塩基性アミノ酸と、エンテロトキシンのアミノ酸番号300付近の、酸性の溝との間での反応であると考えられた(図14)。

#### D. 結論

核酸クロマト法におけるウエルシュ菌エンテロトキシン核酸の検出感度を検討した。既に開発されている従来法であるところの着色ラテックスビーズを用いた核酸クロマトでは、エンテロトキシンRNAの検出には $3 \times 10^9$ コピーが必要だった。ラテックスビーズに酵素を標識し、ハイブリダイゼーション反応の後に酵素発

色反応を行う改良法を開発した。その結果、 $1 \times 10^6$  コピーのエンテロトキシン RNA で陽性反応が目視確認された。この成績は、酵素標識ラテックスビーズを用いると、核酸クロマトによるエンテロトキシン RNA 検出感度が、3,000 倍向上したことを示していて、実用に向けての可能性が認められた。

腸管腔内でのウエルシュ菌生菌の動態を解析できる実験モデルを開発した。トランスウェル中にヒト腸管上皮細胞を培養し、培養液中の菌増殖、細胞障害性、および上皮間電気抵抗値を観察・測定した。その結果、菌増殖と同じ時間経過で細胞障害性と電気抵抗値の低下が観察され、上皮間のバリアが破壊されていることが明らかになった。これらの観察事実は、腸管上皮細胞の代謝に伴う嫌気度の上昇、未同定のウエルシュ菌由来の細胞障害因子、障害を受けた細胞から放出されるウエルシュ菌生菌の増殖刺激因子の存在を想像させる。開発した実験モデルは、ウエルシュ菌食中毒発生機構における、腸管内菌増殖過程の解明に有用であることが示唆された。

腸管上皮細胞の細胞間結合を担っている分子がクローディンであるが、ウエルシュ菌エンテロトキシンは、クローディンの細胞外第2ループのうち、等電点の高い、すなわち、塩基性アミノ酸が並んでいる部分を認識すると考えられた。一方、エンテロトキシンのクローディン結合部分は、アミノ酸306番目から315番目が構成する酸性の溝の部分にある実験結果を得た。以上の結果は、ウエルシュ菌エンテロトキシン

とその受容体クローディンは、静電気的な相互認識結合反応をもって、リガンド-受容体結合を形成すると考えられる。これらの実験事実は、直ちにウエルシュ菌食中毒の発生予防に寄与する物ではないが、複雑な同食中毒の発生機構解明の解明を通じて、食品の安全性担保に貢献するものであろう。

#### E. 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京（2007）
- 2) 片平じゅん、ウエルシュ菌エンテロトキシン、細菌毒素ハンドブック、桜井純ら編集、サイエンスフォーラム、東京（2002）
- 3) Furuse, M., Fujita, K., Kiiiragi, T., Fujimoto, K., and TSukita, S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Boil.* 141: 1539-50 (1998)
- 4) Katahira, J. et al. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin, *J. Cell Biol.* 136: 1239-1247 (1997)
- 5) Fujita, K. et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral

membrane protein, FEBS Lett. 476: 258-261 (2000) なし。

6) McDonel, J.L. and McClane, B.A. Characterization of membrane permeability alterations induced in Vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. Biochim. Biophys. Acta 600:974-985 (1980)

7) 宇治家武史、簡単な遺伝子検査のツール「核酸クロマト法」、臨床化学 36: 19-24 (2007)

#### F. 健康危害情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

Kamiya, J., Abe, H., Kamiani, S., Toshima, H., Fukui, A., Miyake M., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, Y., Horiguchi, Y. (2010) *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. J. Boil. Chem. 285: 401-408.

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案取得

なし。

##### 3. その他

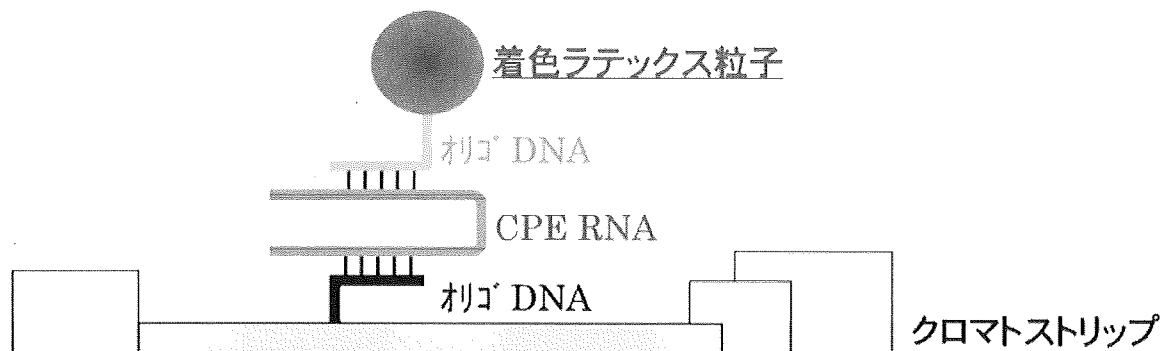


図1 従来の着色ラテックスを用いた核酸クロマト検出法

CPE は *Clostridium perfringens* enterotoxin を示す。