

図2 従来の着色ラテックスを用いての核酸クロマト法による、
ウエルシュ菌エンテロトキシン合成 RNA の検出

3×10^9 コピーのエンテロトキシン RNA が検出されている。

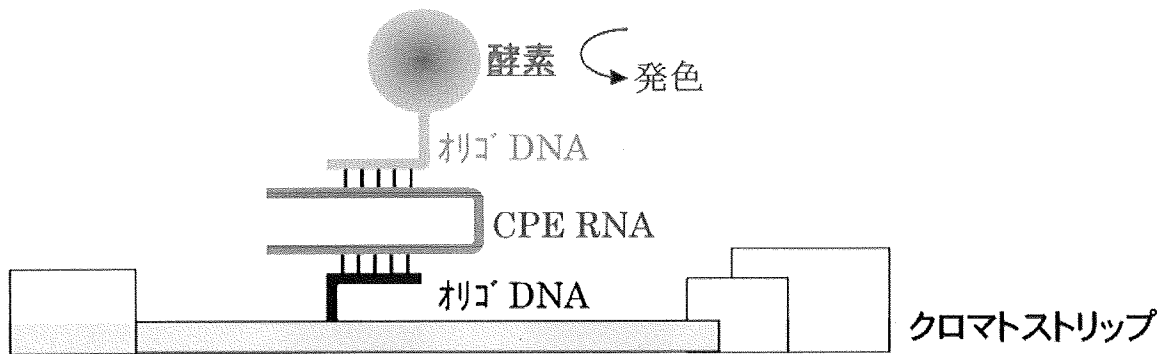


図3 酵素を用いての核酸クロマト検出法

クロマト後のハイブリダイゼーションに続いて酵素発色反応を適応し、検出感度の向上を試みた。CPEは *Clostridium perfringens* enterotoxin を示す。

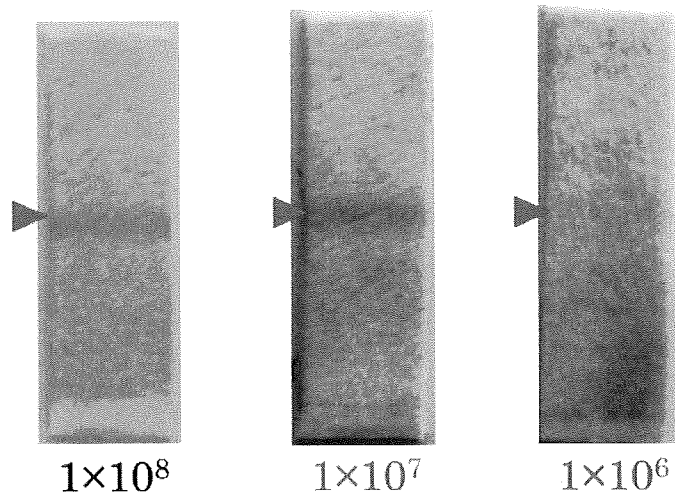


図4 酵素を用いての核酸クロマト法による、ウエルシュ菌エンテロトキシン合成 RNA の検出

エンテロトキシン遺伝子合成 RNA が 1×10^7 コピーのときは確実に、 1×10^6 コピーの時はバンドの読み取り器で測定すると、陽性と判断される。

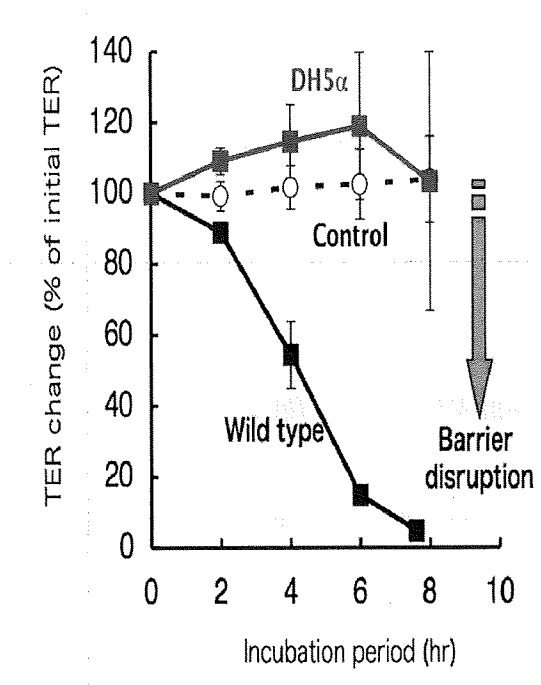
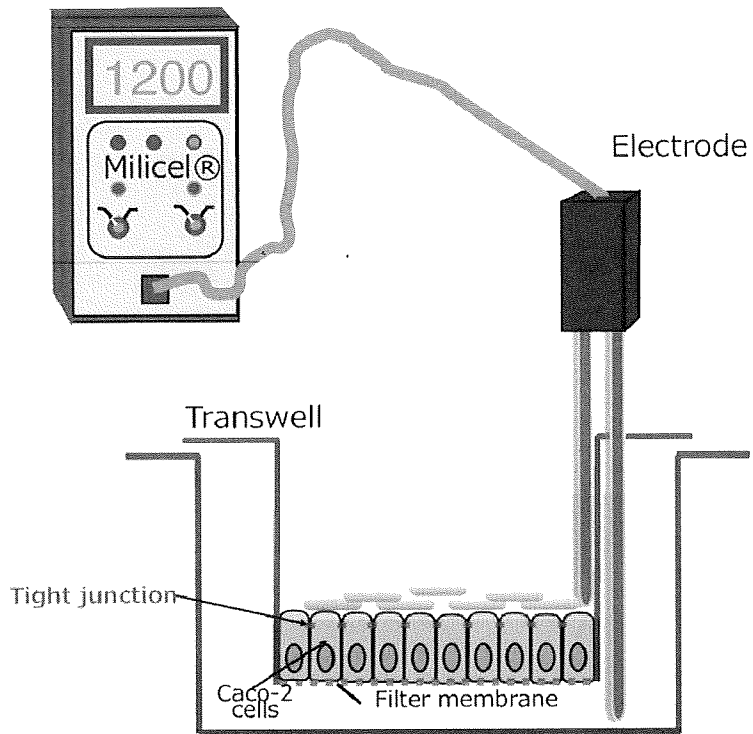


図5 トランスウェルにおける Caco-2 細胞の培養状態と上皮間電気抵抗値の測定法の略図

侵入性大腸菌(Wild type)を接種すると、バリアが障害され、抵抗値が減弱する。

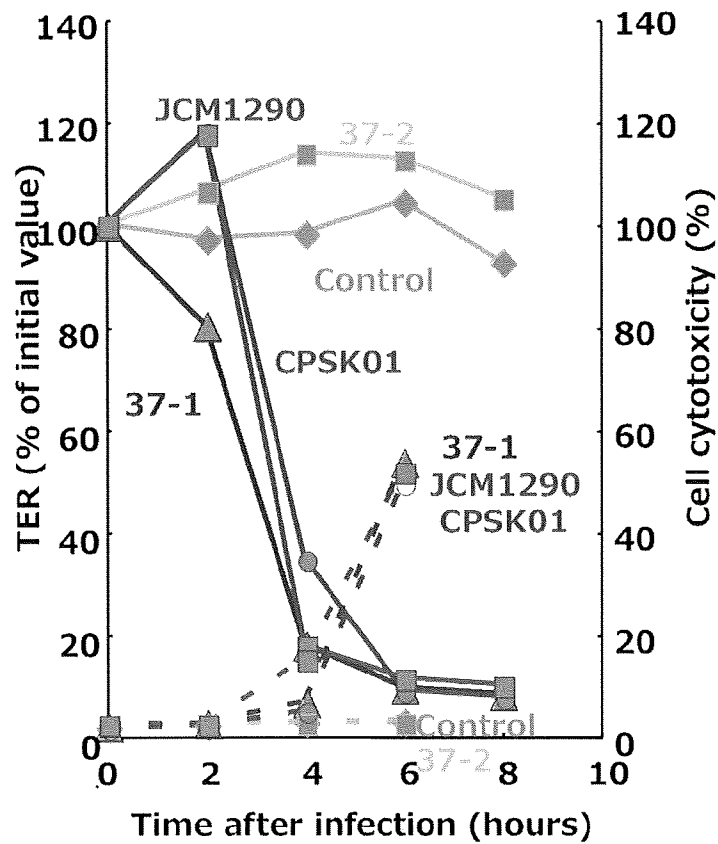


図6 各種ウエルシュ菌を Caco-2 細胞を培養したトランスウェル内に接種した時の、上皮間電気抵抗値と細胞障害性の時間経過

ウエルシュ菌については、本文に記載した。Control は培地を示す。

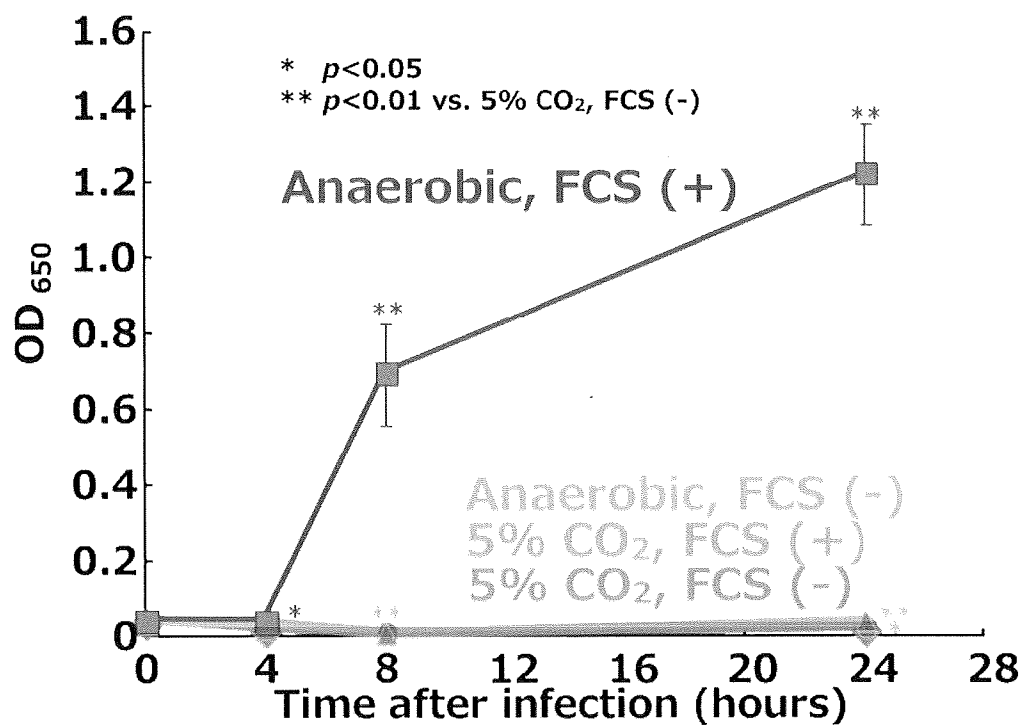


図7 トランスウェル内でのウェルシュ菌の増殖に及ぼす、嫌気状態、5%CO₂ 状態および、ウシ胎児血清 (FCS)の影響

嫌気状態は、嫌気バック中にプレートを保持することによった。

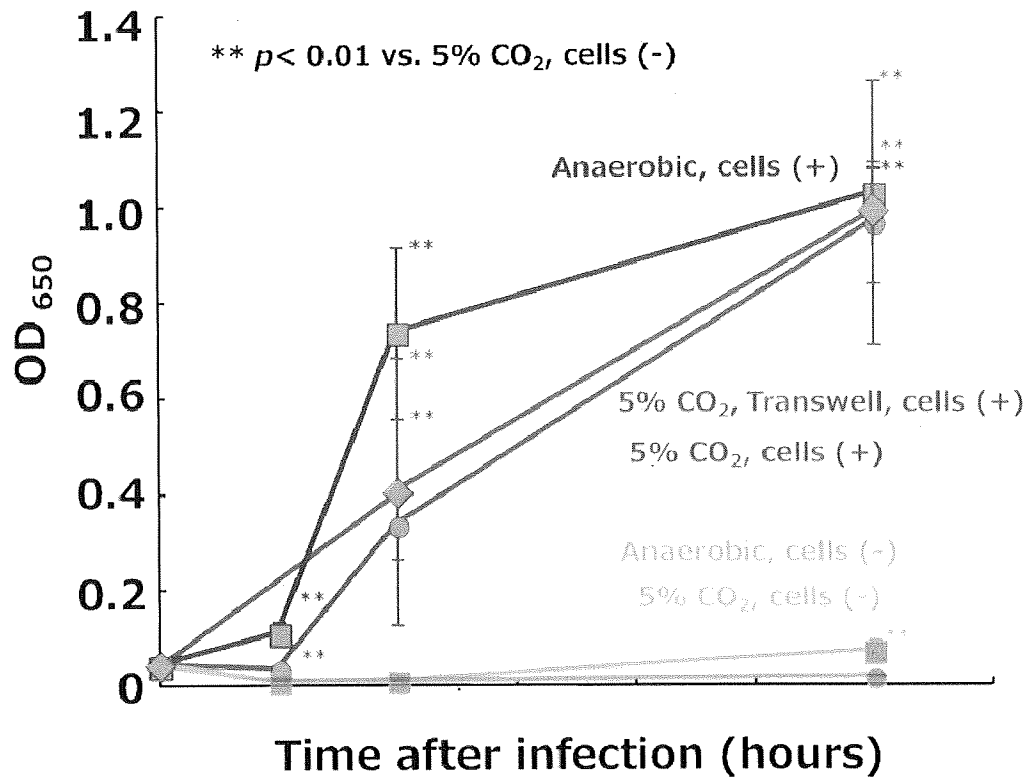


図8 トランスウェル内でのウエルシュ菌の増殖に及ぼす、Caco-2 細胞の有無、嫌気状態、および5%CO₂の影響

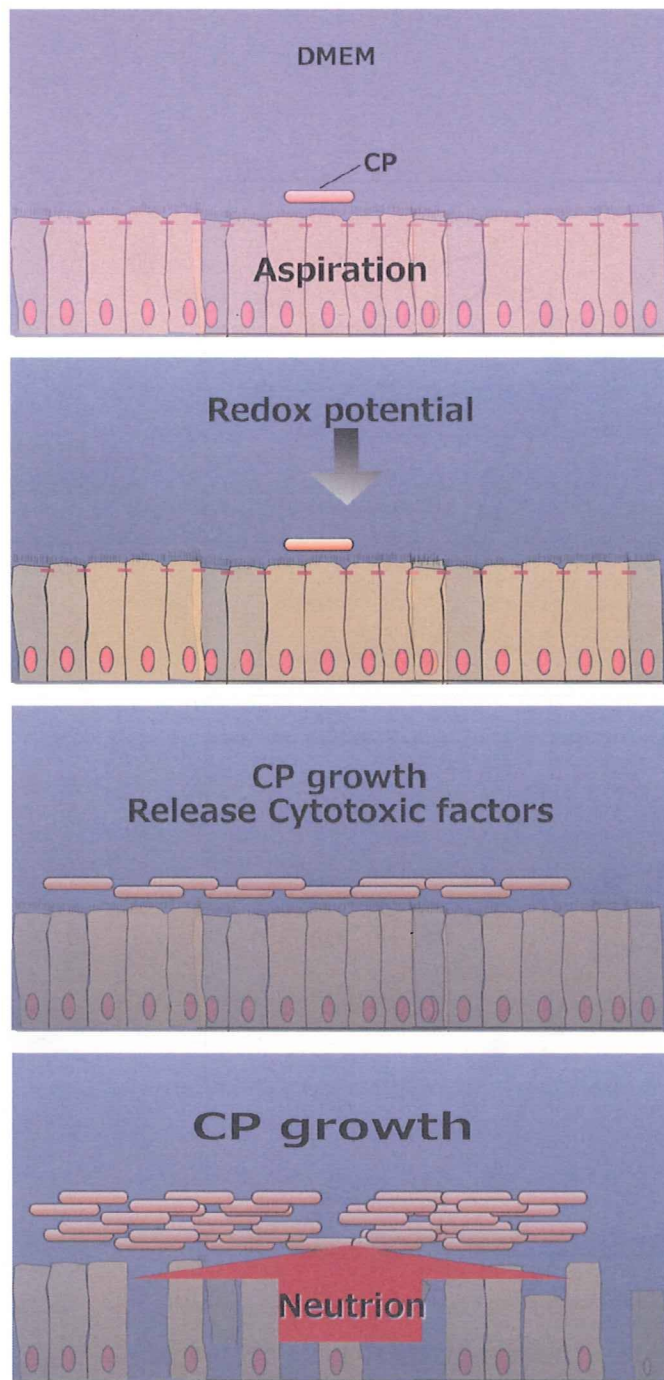


図9 Caco-2 細胞を培養したトランスウェルを腸管腔内と見立てて考察したウエルシュ菌の増殖の動態

酸化還元電位の低下、すなわち嫌気状態の高度化によりウエルシュ菌が増殖し、未同定の因子のために細胞が障害を受け、さらに、その細胞に由来する因子によってウエルシュ菌増殖が起こると考える。

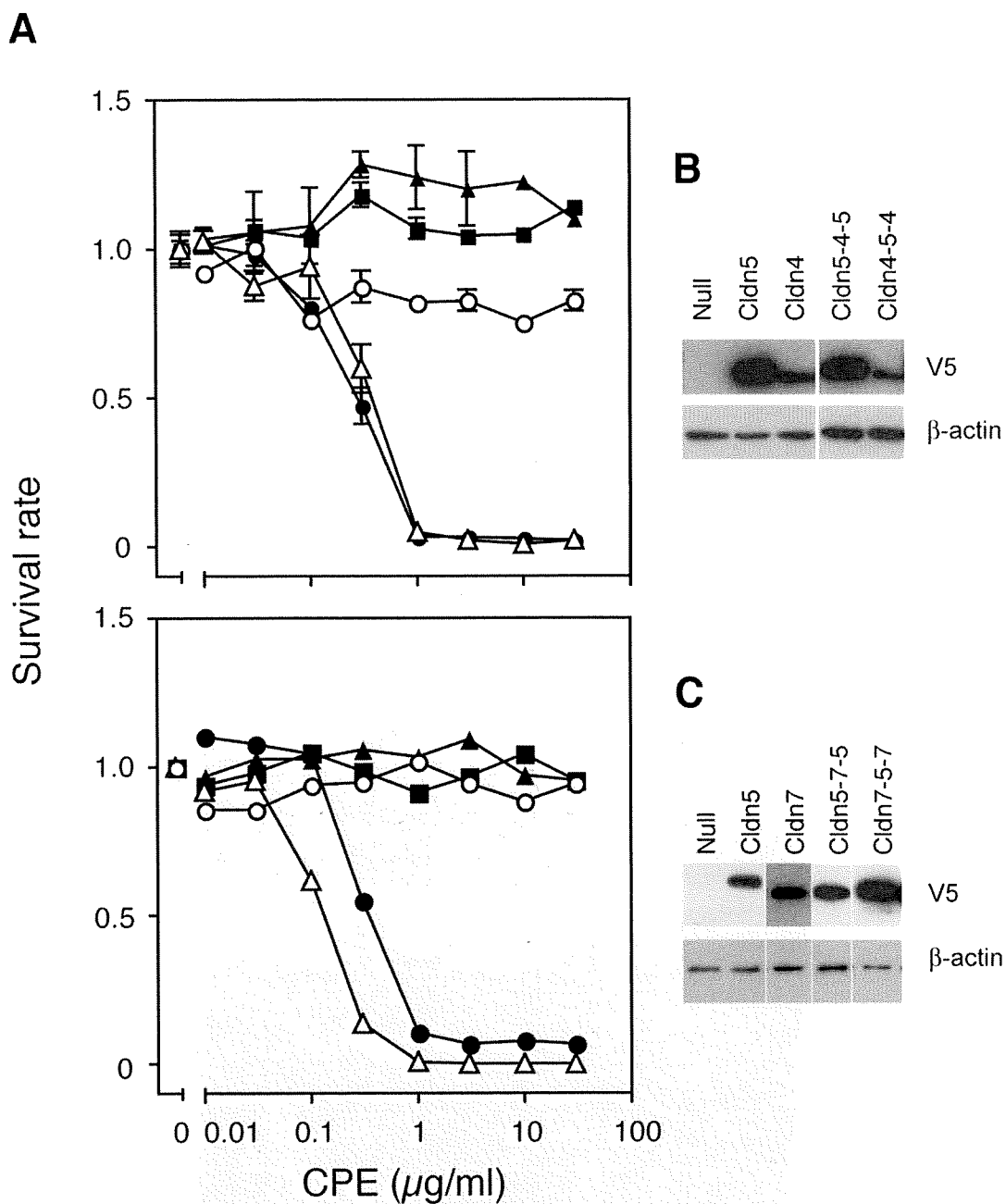


図10 キメラクロードインを発現したL929細胞のウエルシュ菌エンテロトキシン感受性 A:エンテロトキシン感受性 (■発現なし、▲Cldn5、△Cldn5-4-5、●Cldn4、○Cldn4-5-4。BおよびC:ウエスタンブロット法での各クロードインの発現の確認)

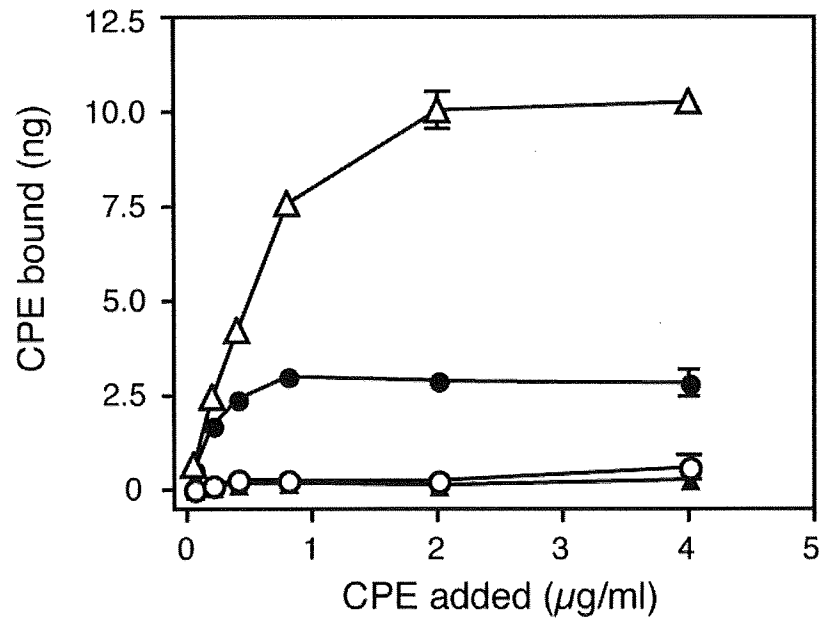
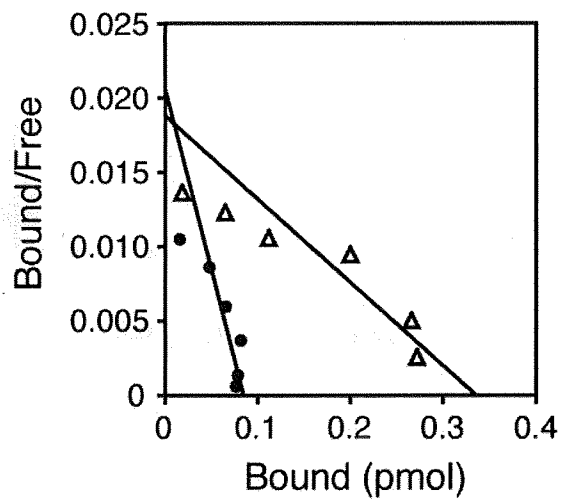
A**B**

図 1 1 クローディンを発現している L929 細胞への ^{125}I 標識ウエルシュ菌エンテロトキシンの結合に及ぼす、エンテロトキシン感受性部位(CPE-SR)の影響

A: ^{125}I 標識ウエルシュ菌エンテロトキシンの結合飽和曲線 ●Cldn4、▲Cldn5、○Cldn4-5-4、△Cldn5-4-5。B:図 A のスキャッチャードプロット

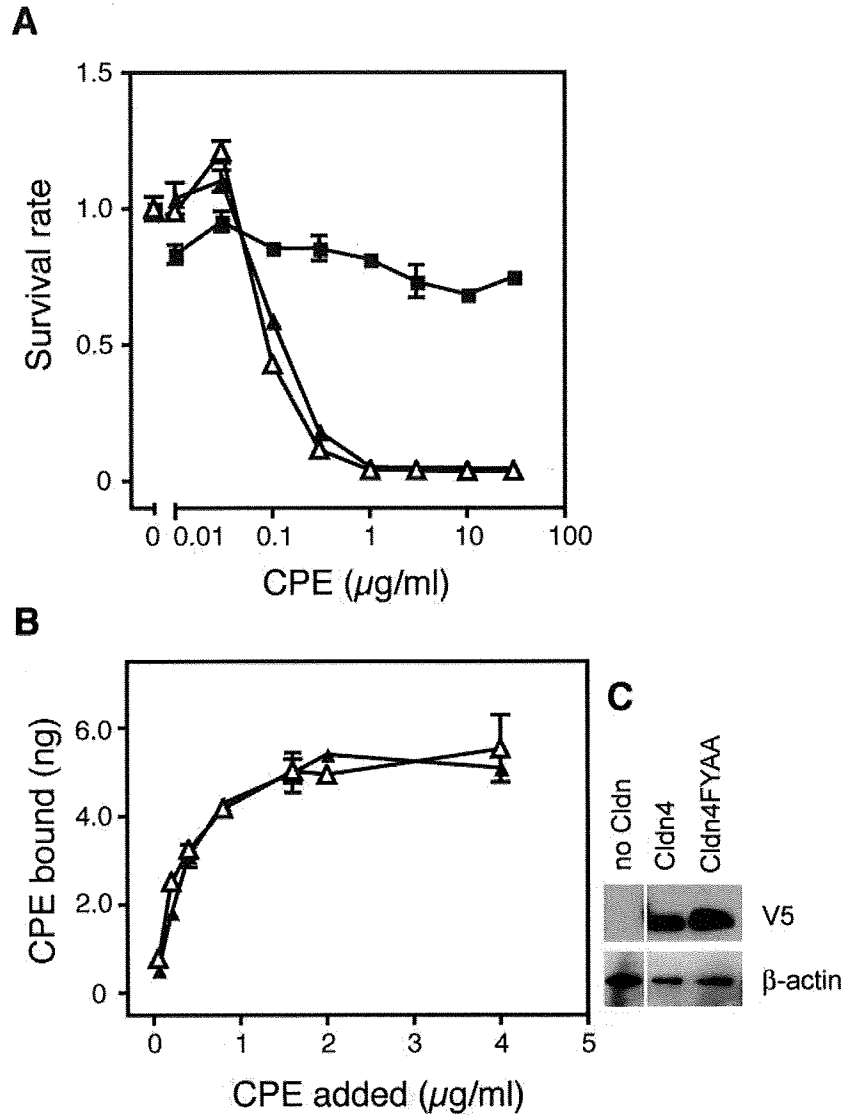


図12 ウエルシュ菌エンテロトキシン受容体としての Cldn4^{FYAA}

A:エンテロトキシン感受性、B: ¹²⁵I 標識ウエルシュ菌エンテロトキシンの結合飽和曲線、C: ウェスタンブロット法での各クローデインの発現の確認

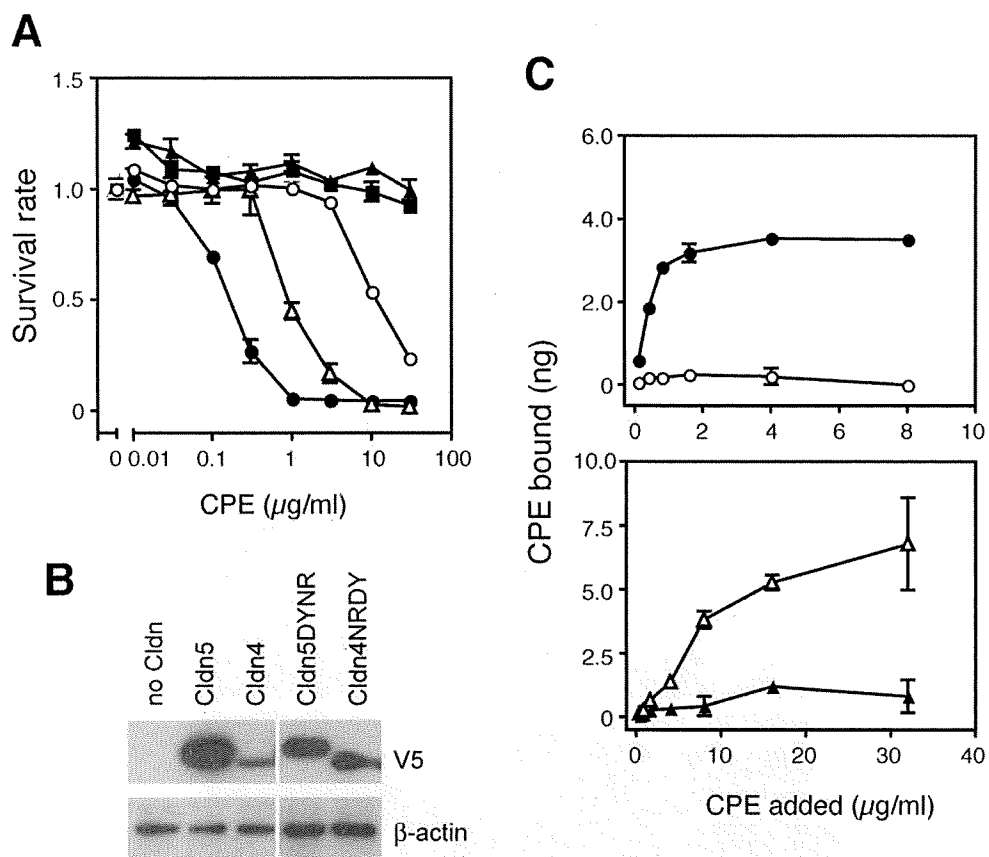


図 13 クローディン分子上のウエルシュ菌エンテロトキシン感受性領域 (Cldn-SR)の静電的性状とクローディンのエンテロトキシン感受性との関係

A: アミノ酸特異的変異をさせたクローディンを発現している L929 細胞のエンテロトキシン感受性、C: ^{125}I 標識エンテロトキシンの結合、B: ウェスタンブロット法でのクローディン発現の確認。●Cldn4、▲Cldn5、○Cldn4NRDY、△Cldn5DYNR、■クローディンなし。

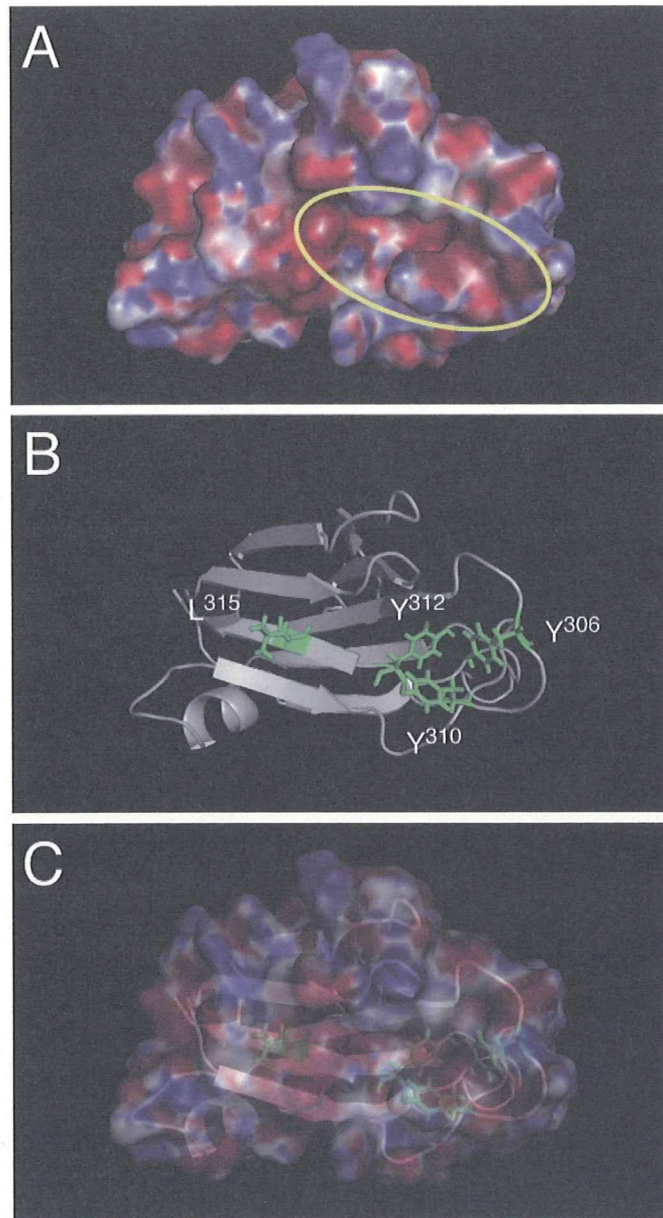


図14 ウェルシュ菌エンテロトキシン C 末端フラグメント中の陰性荷電を持った溝

A: 分子の表面電荷、楕円は溝を示す、B:特異アミノ酸の位置を示すリボンモデル図、C:図の A と B を合成融合したもの

表1 各種クローディンおよびキメラクローディンのアミノ酸配列と、それらを発現した HEK293 細胞のウエルシュ菌エンテロトキシン感受性

エンテロトキシン感受性のカテゴリー: High, EC50 < 1 µg/ml; low, 1 µg/ml ≤ EC50 < 30 µg/ml; Insensitive, 30 µg/ml ≤ EC50. a)アミノ酸配列 b)エンテロトキシン感受性 mean ± SD (µg/ml) c)感受性カテゴリー
hu:ヒト、mk:サル

Claudin Sensitivity ^{c)}	Amino acid sequence ^{a)}	EC50 ^{b)}	
Wild type			
huCldn1	¹³⁹ WYGNRIVQEFYDPMTPVNARYEFGQALFTGW ¹⁶⁹	4.32 ± 2.94	Low
mkCldn4	¹³⁸ WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGASLYVGW ¹⁶⁸	0.18 ± 0.09	High
Chimera			
Cldn4-1(A)	WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREFGQALFTGW	>30	Insensitive
Cldn4-1(B)	WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGQALFTGW	0.50 ± 0.28	High
Cldn4-1(C)	WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGAALFTGW	0.11 ± 0.01	High
Cldn1-4-1(A)	WYGNRIVQEFYNPLVASGQKREMGASLYVGW	0.65 ± 0.23	High
Cldn1-4-1(B)	WYGNRIVQEFYNPLVASGQKREMGAALFTGW	0.46 ± 0.29	High
Cldn1-4-1(C)	WYGNRIVQEFYDPLVASGQKREMGAALFTGW	3.42 ± 0.93	Low
Cldn1-4-1(D)	WYGNRIVQEFYDPMVASGQKREMGAALFTGW	2.08 ± 0.39	Low

表2 各種クローデインを発現した細胞のウエルシュ菌エンテロトキシン感受性

クローデイン分子上のエンテロトキシン感受性領域(CPE-SRs)は太字で示した。a) CPE-SR の東電点。

ms: マウス、 hu: ヒト、 mk: サル、 mh: マウスとヒトとのキメラ mkCldn4 and huCldn1 は HEK293 細胞で、他の Cldns は L929 cells で発現させた。

Claudin	Amino acid sequence	pI ^{a)}	EC50
Highly sensitive	**		
ms Cldn4	NVIRDFYNPMVASG QK REMGAS	9.70	0.21
hu Cldn4	NIIQDFYNPLVASG QK REMGAS	9.70	0.083
mk Cldn4	NIIQDFYNPLVASG QK REMGAS	9.70	0.18
ms Cldn3	TIIRDFYNPLVPEA QK REMGAG	6.53	0.20
ms Cldn7	QIVTDFYNPLTPMNVKY EF GPA	6.40	0.29
ms Cldn8	SIIRDFYNPLVDVAL K RELGEA	6.49	0.69
Low sensitive			
ms Cldn14	DVVQNFYNPL LL PSGM K FEIGQA	6.41	4.7
ms Cldn2	GILRDFYSPLVPDS M KFEIGEA	4.18	4.4
ms Cldn1	GIVQEFYDPLTPINAR Y EFGQA	4.18	12
hu Cldn1	RIVQEFYD PM TPVNAR Y EFGQA	4.18	4.3
Insensitive			
ms Cldn5	IVVREFYDPTVPVS Q KYELGAA	4.18	>30
hu Cldn5	IVVREFYDPSVPVS Q KYELGAA	4.18	>30
hu Cldn10	KITTEFFDP-LFVE Q KYELGAA	3.93	>30
Cldn mutants examined in this study			
hu Cldn4-5-4	NVIRDFYDPSVPVS Q KYELGAS	4.18	>30
hu Cldn5-4-5	IVVREFYNPLVASG QK REMGAA	9.70	0.40
mh Cldn7-5-7	QIVTDFYDPSVPVS Q KYELGPA	4.18	>30
mh Cldn5-7-5	IVVREFYNPLTPMNVKY EF GAA	6.40	0.13
hu Cldn5 ^{DYNR}	IVVREFYN PS VPVS Q KRELGAA	9.70	1.4
hu Cldn4 ^{NRDY}	NIIQDFYDPLVASG Q KYEMGAS	4.18	14

