

腸炎ビブリオ O 抗原リポ多糖 (LPS) の
化学的および血清学的性状に関する研究



甲第22号

2003 年

橋井 則貴

腸炎ビブリオ O 抗原リポ多糖 (LPS) の
化学的および血清学的性状に関する研究

2003 年

橋井 則貴

目次

【総論の部】

序論	3
略号	9
第1章 腸炎ビブリオ O-untypable (OUT) 菌株の O 抗原リポ多糖 (LPS) の化学的・血清学的性状	
1-1. 既知血清型 LPS と OUT 菌株 LPS の糖組成の比較	10
1-2. SDS-PAGE による LPS の分子構築の解析	12
1-3. OUT 菌株の血清学的性状	13
考察	22
第2章 腸炎ビブリオ O2 および KX-V212 の LPS 構成成分として見出された未同定物質の同定	
2-1. FP の分離と精製	24
2-2. FP の NMR 解析	26
2-3. O2 および OUT Non1A の GC-MS による分析	33
考察	35
第3章 腸炎ビブリオ O2 LPS 多糖鎖の構造解析	
3-1. LPS および化学修飾 LPS の化学分析	37
3-2. TOF-MS および FAB-MS による O2 LPS 多糖鎖の解析	38
3-3. NMR による O2 LPS 多糖鎖の構造解析	43
3-4. メチル化分析	49
考察	50
第4章 腸炎ビブリオ OUT 菌株 KX-V212 LPS の構造解析	
4-1. LPS および 化学修飾した LPS の化学分析	52
4-2. KX-V212 LPS 多糖鎖の解析と精製	53
4-3. NMR による PS1' の構造解析	54
4-4. NMR による KX-V212 LPS の lipid A backbone の構造解析	61

4-5. メチル化分析	65
考察	66
第 5 章 ELISA 阻止試験による O2 LPS の血清学的特異性を示す エピトープの解明	
5-1. ELISA および ELISA 阻止試験	67
考察	69
総括	70
謝辞	72
【実験の部】	
一般事項	73
第 1 章に関する実験	78
第 2 章に関する実験	80
第 3 章に関する実験	81
第 4 章に関する実験	82
第 5 章に関する実験	84
引用文献	86

総論の部

【序論】

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は 1950 年に大阪市南部で死者 20 名を含む総患者数 272 名を出した、いわゆる「シラス食中毒事件」の原因菌として Fujino ら [1] によって初めて発見された食中毒原因菌である。以来、腸炎ビブリオは本邦で発生する細菌性食中毒の中で、サルモネラやカンピロバクターと並び、主要食中毒原因菌の位置を保ち続けている。腸炎ビブリオ食中毒の発生時期は本菌の生態に大きく影響される。本菌は本来、海棲細菌であり、冬期は海底の泥土中で越冬し、水温が 17 °C 以上になる夏期にはプランクトンの増殖と共に海水中に遊出する。従って、本邦における腸炎ビブリオ食中毒は、冷夏の影響により一時的な減少はあるものの、その大半は 7~8 月の夏期に沿岸海水域で捕獲される魚介類が感染源となり、平均して毎年発生件数 500~800 件、患者数 5,000~10,000 名の事例が報告されてきた。腸炎ビブリオによる食中毒は平成 10 年以降減少傾向がみられるが、平成 13 年の発生件数は 307 件ののぼり、細菌性食中毒全体の 20.8 % を占め、細菌性食中毒の中ではサルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ／コリによるものに次いで高い発生割合を示している [2]。近年、腸炎ビブリオ食中毒は患者数が 10~50 人の小規模事例が全体の 80 % 以上を占め、平成 13 年においてもその発生件数のうち約 40 % は患者数 1 人の事例であった。しかしながら、1 事例で 500 人以上の食中毒事例が報告されることもある。腸炎ビブリオはわが国のみならず、世界各地の沿岸海水中にも広く分布する。特に、東南アジアやインドにおいて腸炎ビブリオによる食中毒が多発するが、これは調理後の二次汚染や飲料水の汚染が主な原因とされている。また、欧米でも二次汚染を受けたカニやエビを原因食品とする大規模な腸炎ビブリオ食中毒が発生している [3]。このような状況から腸炎ビブリオは、毒素原性大腸菌、サルモネラ属菌、*Plesiomonas shigelloides* とともに海外旅行者下痢症の 4 大原因菌の一つにもなっている。また近年の航空輸送による腸炎ビブリオ汚染域地からの新鮮魚介類の輸入の増加と高速化に伴い、血清学的または遺伝学的に同型菌による食中毒が世界的に発生しており、輸入感染症の病原菌としても食品衛生上注目されている。

腸炎ビブリオは通性嫌気性グラム陰性細菌で形態学的には両端が丸みを帯びた $0.5 \sim 0.8 \times 1.4 \sim 2.6 \mu\text{m}$ の湾曲のない短桿菌である。本菌は海棲細菌であるため、増殖には Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} などの陽イオンを必要とし、2~3 % の NaCl を至適発育濃度とする好塩菌である。また腸炎ビブリオは細菌の中で最も増殖速度の速い部類に属し、至適条件下において doubling time は 8~10 分 (大腸菌やサルモネラでは 20~30 分) であり、腸炎ビブリオに汚染された食品中では 3~4 時間で食中毒を起こす

菌数 ($10^6 \sim 10^7$ 個) に達する。本菌による食中毒の潜伏期間は 10~24 時間程度であり、胃部または上腹部の激痛を主徴とし、37~39 °C の発熱、嘔吐、下痢を伴い、まれに赤痢様の粘液便、粘血便を排出することもある。多くの場合は 2~3 日程度で軽快し、予後は良好である。腸炎ビブリオ感染症では、本菌の産生する耐熱性溶血毒素 (thermostable direct hemolysin; TDH) および TDH 類似毒素 (TDH related hemolysin; TRH) が主要病原因子として挙げられている。TDH はタンパク毒素で、分子量 21,000 のサブユニット 2 個から構成されており、ヒトの赤血球に対しては孔形成毒素 (pore forming toxin) として溶血活性 (神奈川現象) を示すと考えられている。また TDH は細胞致死活性を有することが知られているが、有核細胞の場合は赤血球などの無核細胞とは異なり、細胞内部からも作用してアポトーシスを惹起することが示唆されている [4]。さらに本菌感染症患者は心電図上で QTc 延長および ST-T が変化することが確認されており [5]、TDH の心臓、血管系への影響が指摘されている。このように TDH および TRH は様々な生理活性を有するが、これら毒素の分泌、侵入機構は未だ解明されておらず、腸炎ビブリオの感染から発症に至るまでの過程は不明瞭な点が多い。さらに患者分離菌株の中には TDH、TRH 非産生菌も分離されており、これらの毒素だけで腸炎ビブリオ感染症の病態を論じることは困難である。

腸炎ビブリオには、現在 13 種の血清型 (O 抗原型) が存在することが知られている [6~9]。これらの O 抗原型を決定する因子は、細胞壁外膜に局在する耐熱性細胞表層抗原、すなわち O 抗原リポ多糖 (lipopolysaccharides; LPS) である。LPS は血清型の決定因子としてのみならず、細菌内毒素 (endotoxin) としてそれ自身が endotoxin shock や発熱原性、致死毒性などの多彩な生物活性を示し、グラム陰性細菌の病原因子の一つとしても重要な菌体構成成分である。グラム陰性菌の LPS は、化学構造の違いにより Fig. 1 に示した様に S (smooth) 型、R (rough) 型、LOS (lipooligosaccharide) 型の 3 つのタイプに分類することができる [10]。S 型 LPS は多くのグラム陰性細菌に見られる最も一般的な構造をもつものであり、O 抗原特異多糖鎖、コアオリゴ糖 および lipid A の三つの領域で構成されている。O 抗原特異多糖鎖は、数種の単糖で構成される repeating unit と称される oligosaccharide が反復重合した高分子多糖鎖であり、この領域がグラム陰性細菌の血清型を決定する。グラム陰性細菌の血清型の相違には、repeating unit を構成している構成糖の種類、配列、結合様式の違いが反映される。Lipid A は、構造的に殆どの菌種の LPS において β (1→6) 結合した glucosamine の disaccharide backbone をもち、それにアミド結合およびエステル結合した高級脂肪酸とリン酸で構成されている。

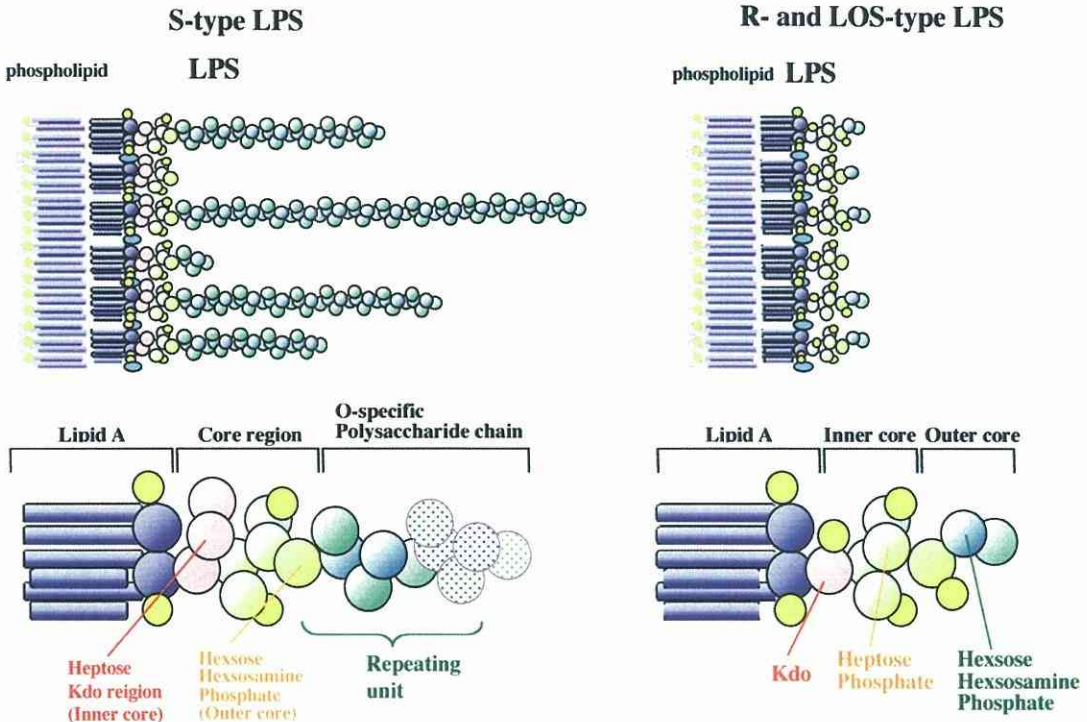


Fig. 1 Schematic structure of gram negative bacteria LPS.

コアオリゴ糖は O 抗原特異多糖鎖と lipid A を結合する部位であり、さらに内部コア (inner core) と外部コア (outer core) とに分けられる。Outer core は、glucose、galactose などの hexose で構成されており、別に hexose 領域とも称される。Inner core は、自然界に非常に稀な糖である 3-deoxy-D-manno-octo-2-ulosonic acid (Kdo) と heptose から構成されており、通常、Kdo が lipid A の非還元末端側の glucosamine とケトシド結合している。また、Kdo はコア部分の免疫学的特異性に関与していることも報告されている [11、12]。Kdo と lipid A との間のケトシド結合は弱酸加水分解で容易に切断され、このことを利用して LPS を親水性の多糖部と疎水性の lipid A とに分画することができる [10]。R 型 LPS は、S 型菌 (親株) が遺伝的に O 抗原特異多糖鎖の合成能を欠損した変異株 (R-mutant) の LPS で、親株 LPS のコアオリゴ糖 (またはその一部) と lipid A で構成されている。R 型 LPS は O 抗原特異多糖鎖を欠損するため、親株の S 型 LPS がもっていた血清学的特異性が失われており、同一菌種間では血清型に関係なく R 型として共通の抗原性を示すことが多い。R-Mutant は菌体表層の親水性を担う O 抗原特異多糖鎖を欠損するため、生体防御機構からの攻撃を受けやすく、多くの場合、親株のもっていた病原性も失われる。

LOS 型 LPS の化学構造は R 型 LPS と類似しており、S 型 LPS の O 抗原特異多糖鎖に相当する高分子多糖鎖をもっていない[13]。しかし、LOS 型 LPS は R 型 LPS と異なり、明瞭な血清学的特異性を示す。この LOS 型 LPS をもつ菌種としては、これまでいわゆる nonenteric mucosal pathogen と称される *Neisseria meningitidis* (髄膜炎菌)、*Neisseria gonorrhoeae* (淋菌)、*Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌)、*Bordetella pertussis* (百日咳菌) などが知られており、R-mutant と異なり、いずれも強い病原性を示すことが特徴である。

腸炎ビブリオ LPS の化学組成や血清学的性状については、これまでいくつかの報告があり、その化学的特徴が明らかにされてきた。Hisatsune ら [14, 15] や Miyano ら [16] は、腸炎ビブリオ O1~O13 までの血清型 LPS についてはじめて糖組成を明らかにした。Hisatsune ら [14] や Kondo ら [17] は腸炎ビブリオ LPS では、ほとんどのグラム陰性細菌 LPS の構成成分である Kdo が、O6 LPS を除いてその検出法である過ヨウ素酸/チオバルビツール酸 (TBA) 反応 [18] では検出されず、LPS の強酸加水分解物中に Kdo-リン酸が検出されること、さらに O7 と O12 では、TBA 反応に陽性を示すが Kdo とは異なる物質が含まれることを示した。この Kdo 様物質は、後に Kondo ら [19] により 3-deoxy-D-threo-hexo-2-ulosonic acid であると同定された。さらに Kondo ら [20] は、O12 LPS の lipid A backbone を含めた全多糖鎖の構造解析を行い、O12 LPS 多糖鎖は 9 種類 10 個の糖で構成される短い糖鎖であることを解明するとともに、O12 LPS では Kdo は Kdo-4 リン酸として 1 分子しか存在せず、そのため TBA 反応によっては検出されないことを示した。また、これと同様な Kdo 領域の構造は O12 以外の血清型 LPS においても認められ、さらには、*vibrio* 科を構成する他の多くの菌種の LPS にも共通する特徴であることを強く示唆した [17, 21, 22]。一方、Iguchi ら [23] は、腸炎ビブリオ O1~O13 のすべての血清型 LPS についてラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) と、LPS から分離した LPS 多糖部の gel-permeation chromatography による分析を行い、腸炎ビブリオではすべての O 抗原型 LPS が O12 LPS と同様に、化学的には R 型 LPS のそれに相当する短鎖の糖鎖で構成されること、さらに 13 種の血清型 LPS は糖組成に基づく化学分類により 10 種の化学型に分類できることを示した [14, 15, 17, 23]。このように腸炎ビブリオは enteric mucosal pathogen であるにもかかわらず、いわゆる nonenteric mucosal pathogen と同様に LOS 型の分子構造の LPS をもつことから、腸炎ビブリオ LPS では S 型 LPS の core oligosaccharide に相当する低分子量の糖鎖の構造の違いが血清型に反映されることが示された。しかしながら、13 種の血清型のうち、血清学的特異性を担う LPS

糖鎖の構造が解明されているのは前述の O12 のみであり、他の血清型 LPS ではその構造は依然として不明である。さらに、腸炎ビブリオの血清型を決定するエピトープの構造に至っては全く解明されていないといっても過言ではない。

現在、患者由来の腸炎ビブリオの血清型は前述のように 13 種の血清型に型別されている。しかしながら食中毒患者から分離される腸炎ビブリオの中には既知血清型の診断用抗血清に対して明瞭な凝集を示さず、菌体凝集反応では血清型別が困難な O-untypeable (OUT) 菌株がしばしば存在する。さらに食中毒患者から既知血清型の腸炎ビブリオが分離されるにもかかわらず、その推定原因食品から検出される腸炎ビブリオは OUT 菌株のみで、感染経路が未同定のケースが多数生じている。これらの問題は日本国内にとどまらず、腸炎ビブリオ感染症の最も深刻な東南アジアにおいても同様に発生している。分離された OUT 菌株は通常、それ以上の血清型別試験に供されることは少なく、多くの場合は OUT 菌株として処理される。しかしながらこのような OUT 菌株の存在は感染源の特定と感染防止対策に大きな障害をもたらしている。従って、腸炎ビブリオ OUT 菌株 LPS の化学的、血清学的性状を解明し、その血清型を明らかにすることは臨床現場における早期診断、さらには腸炎ビブリオの感染源と感染経路の特定、および多次感染の防止のために非常に重要である。一方で腸炎ビブリオは、既知血清型株間で幅広い類族反応（共通抗原性）を示す。このため、腸炎ビブリオの血清型別には高度に吸収された特異血清が必要とされ、その調製には多大な労力と時間を要する。従って、腸炎ビブリオ LPS の構造解析と、各血清型の特異性を決定するエピトープの解明は、各血清型に特異的な人工抗原の開発とそれを用いたより迅速且つ正確な血清学的診断につながり、臨床的にも有用性が高いと考えられる。これらの状況をふまえ、本研究では以下の目的にそって研究を行った。

1. 主に東南アジアで分離された腸炎ビブリオ感染症患者由来の 7 種の OUT 菌株から LPS を抽出精製し、その多糖部の糖組成を中心とした化学的性状を、既知血清型菌株の LPS 多糖部の化学的性状と比較検討し、さらに、抽出精製した LPS を用いる血清反応により、これらの OUT 菌株の血清型 (O 抗原型) を決定する。
2. OUT 菌株 KX-V212 と既知血清型 O2 菌株の LPS に見出された ノイラミン酸類似の新規物質の構造を明らかにする。

3. 全血清型 LPS の糖鎖構造を解明する一環として、O2 LPS の全糖鎖の構造を決定する。
4. O2 と共通抗原性を示し、且つ、従来知られていない血清型であることが判明した KX-V212 の LPS について、O2 LPS と同様にその全多糖鎖の構造を解明し、両者の構造上の相違を検討する。
5. LPS を固定化抗原として用いる ELISA および ELISA 阻止試験を行い、O2 LPS の血清学的特異性を発現するエピトープを解明する。

【略号】

本論文中に使用した略号を以下に記載する。

糖質		NMR 関連	
Man:	mannose	COSY:	correlation spectroscopy
Glc:	glucose	PDQF-COSY:	phase sensitive double quantum filter COSY
Gal:	galactose	PHSQC:	phase sensitive ¹ H detected single quantum coherence
Xyl:	xylose	HMQC:	heteronuclear multiple quantum coherence
L,D-Hep:	<i>L-glycero-D-manno</i> -heptose	FG-HMQC:	field gradient-HMQC
D,D-Hep:	<i>D-glycero-D-manno</i> -heptose	HMBC:	heteronuclear multiple bond connectivity
GlcN:	Glucosamine	TOCSY:	total correlation spectroscopy
GalN:	Galactosamine	NOESY:	nuclear Overhauser effect spectroscopy
3,6dGlcN:	3-amino-3,6-dideoxy-glucose	PHOHAHA:	phase sensitive homonuclear Hartman-Hahn spectroscopy
GlcA:	glucuronic acid	質量分析関連	
GalA:	galacturonic acid	GC:	gas chromatography
Kdo:	3-deoxy- <i>D-manno</i> -octo-2-ulosonic acid	GC-MS:	GC-mass spectrometry
O2 NonIA:	5,7-di-(<i>N,N'</i> -di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy- <i>D-glycero-D-galacto</i> -non-2-ulosonic acid	FAB-MS:	fast atom bombardment-mass spectrometry
OUT NonIA:	5-(<i>N</i> -acetyl)-amino-7-[<i>N</i> -(<i>N</i> -acetyl)- <i>D</i> -alanyl]-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy- <i>D-glycero-D-galacto</i> -non-2-ulosonic acid	MALDI-TOF MS:	matrix-assisted laser/desorption ionization-time of flight mass spectrometry
脂肪酸			
3-OH-C12:0:	3-hydroxy-dodecanoic acid		
C14:0:	tetradecanoic acid		
3-OH-C14:0:	3-hydroxy-tetradecanoic acid		
C16:0:	hexadecanoic acid		

第1章 腸炎ビブリオ O-untypeable (OUT) 菌株の O 抗原リポ多糖 (LPS) の化学的・血清学的性状

1-1. 既知血清型 LPS と OUT 菌株 LPS の糖組成の比較

腸炎ビブリオの 13 種の血清型は LPS の糖組成に基づく化学分類において、10 種の化学型に分類される。そこでまず、OUT 菌株より抽出・精製した LPS について、その糖組成を既知血清型 LPS のそれと比較し、これらの OUT 株 LPS がどの化学型に属するかを検討した。

OUT 菌株 AD-7999、W-90144、U-6443 および既知血清型 O2 の LPS の糖組成を Table 1-1 に示した。これらの菌株の LPS はいずれも構成糖として Glc、Gal、L,D-Hep、D,D-Hep、GlcN およびウロン酸を含み、それらの構成モル比も非常に類似していた。すなわち、これら OUT 3 菌株の LPS は糖組成に基づく化学分類では O2 LPS の化学型である化学型 II に属することが示された。

Table 1-1. Sugar composition of LPS isolated from *V.parahaemolyticus* O2 and OUT strains

Component sugar	LPS			
	O2	AD-7999	W-90144	U-6443
Glc	0.309	0.212	0.230	0.193
Gal	0.176	0.106	0.163	0.152
L,D-Hep	0.031	0.014	0.023	0.025
D,D-Hep	0.042	0.011	0.028	0.017
GlcN	0.396	0.268	0.195	0.169
Uronic acid	0.465	0.495	0.438	0.360
Kdo	- ^{a)}	-	-	-
Kdo-P	+ ^{b)}	+	+	+
Chemotype	II			

Values were expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ LPS. a) Not detectable by TBA reaction. b) Detected by GC-MS.

腸炎ビブリオ O4 と OUT 菌株 X-3972 の LPS の糖組成を Table 1-2 に示した。両菌株 LPS は構成糖としては Glc、Gal、Fuc、Ara、L,D-Hep、GlcN、GalN、3,6-dGlcN、ウロン酸を含み、定量的にもほぼ一致した糖組成を示した。従って X-3972 菌株は O4 LPS の化学型である化学型 IV に属することが示された。

Table 1-2. Sugar composition of LPS isolated from *V.parahaemolyticus* O4 and OUT strain

Component sugar	LPS	
	O4	X-3972
Glc	0.231	0.355
Gal	0.024	0.041
Fuc	0.157	0.174
Ara	0.172	0.171
L,D-Hep	0.149	0.120
GlcN	0.146	0.146
GalN	0.083	0.080
3,6-dGlcN	0.077	0.070
Uronic acid	0.457	0.612
Kdo	- ^{a)}	-
Kdo-P	+ ^{b)}	+
Chemotype	IV	

Values were expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ LPS. a) Not detectable by TBA reaction. b) Detected by GC-MS.

化学型 III に分類される O3、O5、O11 および O13 の LPS と OUT 菌株 90A-6611、AK-33473 および KX-V212 の LPS の糖組成を Table 1-3 に示した。これらの菌株の LPS はいずれも構成糖として Glc、Gal、L,D-Hep、GlcN およびウロン酸を含み、3 種の OUT 菌株の LPS は化学型 III に属することが明らかとなった。しかしながら、90A-6611 と KX-V212 の LPS には、2 M TFA による加水分解では L,D-Hep は他の菌株の LPS と比べて非常に低い含量（約 1 / 10）でしか検出されなかった。これら両 LPS を 2 M HCl で 100 °C、16 時間加水分解した後では、それぞれの LPS における L,D-Hep の含量は最大値（それぞれ 0.209 と 0.254 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ）となった。すなわち、これら両 LPS 中の L,D-Hep は酸加水分解に対して抵抗性をもつ結合様式で存在しており、それらの LPS 多糖鎖は他の血清型の LPS 多糖鎖とは異なる構造をもつことが示唆された。本研究で用いた 7 種の OUT 菌株の LPS からは、通常の TBA 反応によって Kdo は検出されなかった。しかし既知血清型腸炎ビブリオの LPS でも O6 LPS を除いて Kdo は検出されず、LPS の強酸加水分解産物中に Kdo-リン酸が検出されることが知られている [17]。LPS を methanolysis 後アセチル化した産物の GC-MS ではすべての OUT 菌株 LPS から Kdo-リン酸が検出され、LPS 中の Kdo-リン酸の存在が明らかとなった。

Table 1-3. Sugar composition of LPS isolated from *V.parahaemolyticus* O3, O5, O11, O13 and OUT strains

Component	LPS						
	O3	O5	O11	O13	AK-33473	90A-6611	KX-V212
sugar							
Glc	0.506	0.250	0.333	0.217	0.270	0.227	0.343
Gal	0.228	0.317	0.456	0.200	0.415	0.225	0.221
L,D-Hep	0.343	0.319	0.348	0.310	0.271	0.034	0.026
GlcN	0.223	0.229	0.313	0.251	0.162	0.277	0.199
Uronic acid	0.405	0.454	0.418	0.407	0.391	0.522	0.648
KDO	- ^{a)}	-	-	-	-	-	-
KDO-P	+ ^{b)}	+	+	+	+	+	+
Chemotype	III						

Values were expressed as $\mu\text{mol/mg}$ LPS. a) Not detectable by TBA reaction. b) Detected by GC-MS.

以上、7種のOUT菌株のLPSについて糖組成を検討した結果、いずれのOUT菌株のLPSも既知の化学型に分類されること、また常法ではKdoが検出されずKdo-リン酸が検出されること、およびウロン酸を含むことなど、O1~O13の血清型LPSに見出されている化学的特徴をもつことが示された。

1-2. SDS-PAGEによるLPSの分子構築の解析

先にも述べたように、グラム陰性細菌のLPSはその化学構造(分子構築)の違いによってS型とR型に分類される。このようなLPSの分子構築の違いを知る方法としてSDS-PAGEが最も多用される。SDS-PAGEにおいては、repeating unitで構成される高分子量のO抗原多糖鎖をもつS型LPSはゲル上部の高分子領域に、一方、高分子のO抗原多糖鎖を欠損するR型LPSはゲル下部の低分子領域に泳動される。さらに、S型LPSであっても多糖鎖の生合成過程において生じる分子の不均一性(主にrepeating unitの数の違い)により高分子領域から低分子領域にかけて多数のバンドとして泳動される。本研究ではまずOUT菌株より抽出・精製したLPSの分子構築をSDS-PAGEによって検討した。腸炎ビブリオO4、O11およびOUT菌株X-3972、W-90144、90A-6611、KX-V212、AK-33473のLPSのSDS-PAGEにおける泳動パターンをFig. 1-1に示した。S型LPSの対照としては*Shigella flexneri* 2a(Sh.fle.2a)のLPSを、R型LPSの対照としては*Salmonella* Minnesota R595(S.M.R595)のLPSをそれぞれ用いた。典型的S型LPSであるSh.fle.2aのLPSは、上述のように主にO抗原特異多糖鎖を構成するrepeating unitの数の違いに起因するLPS分子の不均一性を示し、高分子領域から低分子領域にかけて多数のバン

ドとして泳動された。一方、R 型 LPS である S.M.R595 LPS は低分子領域に数本のバンドとして泳動され、典型的な R 型 LPS の泳動パターンを示した。これに対して腸炎ビブリオ LPS ではいずれも高分子領域にはバンドは認められず、低分子領域に数本のバンドとして泳動され、R 型 LPS と類似した泳動パターンを示した。このことは OUT 菌株の LPS も既知血清型腸炎ビブリオの LPS と同様に repeating unit で構成される高分子の O 抗原特異多糖鎖をもたず、LOS 型 LPS であることを示すものであった。

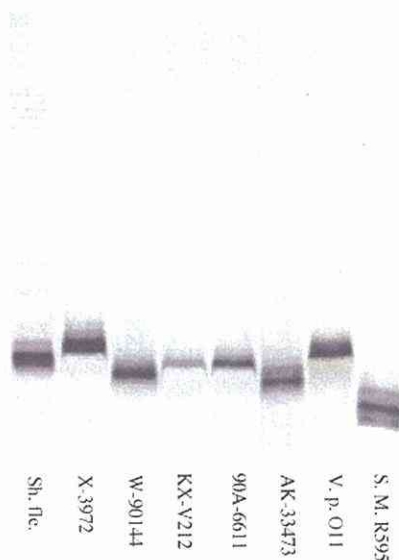


Fig. 1-1. SDS-PAGE of LPS from *V. parahaemolyticus* OUT strains

1-3. OUT 菌株の血清学的性状

1-3-1. 受身溶血 (PH) 試験による解析

OUT 菌株の血清学的性状を LPS を感作抗原として用いる PH 試験によって検討した。診断用抗 O1~O11 特異抗血清を用いた PH 試験の結果を Table 1-4 に示した。各診断用抗血清では対応するそれぞれの血清型 LPS 感作血球に対し、溶血活性において高い抗原特異性が認められた。一方、抗 O2 抗血清は、AD-7999、W-90144 および U-6443 LPS 感作血球に対しても、また抗 O4 抗血清は X-3972 LPS 感作血球に対して強い溶血活性を示した。しかしながら、化学型 III に属する AK-33473、90A-6611 および KX-V212 LPS 感作血球に対しては既知血清型抗血清は全く溶血活性を示さなかった。診断用抗血清が入手できない O12 と O13、および OUT 菌株の全菌抗血清 (未吸収抗血清) を用いて同様に PH 試験を行った。その結果を Table 1-5 に示した。抗 AD-7999、W-90144 および U-6443 抗血清はいずれも既知血清型では O2 LPS 感作血球に対して強い溶血活性を示し、さらに AD-7999、W-90144 および U-6443 のいずれの LPS 感作血球に対しても強い溶血活性を示した。即ち O2、AD-7999、W-90144 および U-6443 の LPS の間には強い血清学的交叉反応原性が認められた。従って化学型 II に属するこれらの OUT 3 菌株の血清型は O2 であることが示唆された。

Table 1-4. Fifty percent passive hemolysis titers of antisera against *V. parahaemolyticus* O1~O11

Antigen (LPS)	Antiserum										
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11
O1	28,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O2	-	1,380	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O3	-	-	5,540	-	-	-	-	-	-	-	-
O4	-	-	-	1,450	-	-	-	-	-	-	-
O5	-	-	-	-	4,110	-	-	-	-	-	-
O6	-	-	-	-	-	1,030	293	-	-	-	-
O7	-	-	-	-	-	-	524	-	-	-	-
O8	-	-	-	-	-	-	-	3,530	-	-	-
O9	-	-	-	-	-	-	-	-	4,000	-	-
O10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,990	-
O11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,750
O12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,490	-
O13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X-3972	-	-	-	2,070	-	-	-	-	-	-	-
AD-7999	-	2,560	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W-90144	-	726	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U-6443	-	882	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AK-33473	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90A-6611	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KX-V212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Antisera were diagnostic antisera (DENKA SEIKEN Co. Ltd.) .

- : less than 200

Table 1-5. Fifty percent passive hemolysis titers of antisera against *V. parahaemolyticus* O12, O13 and OUT strains

Antigen (LPS)	Antiserum								
	O12	O13	X-3972	AD-7999	W-90144	U-6443	AK-33473	90A-6611	KX-V212
O1	741	-	-	-	-	-	-	-	-
O2	-	1,520	-	11,100	20,800	29,400	-	6,860	6,860
O3	741	10,500	-	-	-	773	-	-	264
O4	951	-	31,300	-	-	-	-	-	-
O5	-	-	-	312	3,680	2,110	1,310	-	1,970
O6	420	-	-	-	-	-	305	459	348
O7	4,110	-	-	-	-	-	-	-	-
O8	692	-	-	-	-	-	761	-	-
O9	741	-	-	-	-	-	611	-	-
O10	9,970	-	-	-	-	-	-	-	-
O11	-	641	-	2,900	3,090	3,810	1,380	429	773
O12	15,700	-	-	-	-	-	-	-	-
O13	-	11,900	-	-	1,210	4,370	-	492	-
X-3972	-	-	36,200	-	-	-	-	-	-
AD-7999	-	1,480	-	15,400	58,800	31,500	1,450	10,800	19,400
W-90144	-	1,080	-	11,600	37,500	38,800	-	7,350	15,800
U-6443	-	1,190	-	13,300	25,600	38,800	-	9,050	11,100
AK-33473	-	-	-	-	-	606	6,720	360	1,390
90A-6611	-	-	-	1,310	1,600	5,970	200	22,300	67,600
KX-V212	-	-	-	1,600	1,970	2,600	-	14,700	25,600

Antisera were non-absorbed anti-whole cell rabbit antisera.

- : less than 200

O4 LPS 感作血球に対しては全菌抗血清の中では抗 X-3972 抗血清のみが強い溶血活性を示した。すなわち O4 と X-3972 LPS の間には交叉反応原性が認められ、X-3972 の血清型は O4 であることが強く示唆された。化学型 III に属する AK-33473 の全菌抗血清は既知血清型では O5、O6、O8、O9、O11 の LPS 感作血球に対して弱いながら溶血活性を示した。一方、同じく化学型 III に属する 90A-6611 と KX-V212 の全菌抗血清は、両 OUT 菌株の LPS 感作血球に対してのみならず、化学型 II に属する O2、AD-7999、W-90144、U-6443 の LPS 感作血球に対しても強い溶血活性を示した。以上の PH 試験の結果、化学型 III に属する 3 菌株は既知の O1~O13 とは異なる血清型である可能性が示唆された。

1-3-2. 吸収試験

次に 7 種の OUT 菌株の血清型を決定することを目的として、それらに対する全菌抗血清を、PH 試験で血清学的交叉反応原性の認められた血清型の菌体で吸収し、その吸収抗血清を用いて同様に PH 試験を行った。O2 LPS 感作血球に対して強い溶血活性を示した抗 AD-7999、W-90144 および U-6443 抗血清を O2 およびその他の血清学的交叉反応原性を示した血清型株の菌体で吸収すると、いずれもこれらの菌株の LPS で感作した血球に対する溶血活性は完全に消失した (Table 1-6、7、8)。さらに、抗 O2 抗血清を AD-7999、W-90144 および U-6443 菌体で吸収した吸収抗血清も Table 1-9 に示した様に、その溶血活性は完全に消失した。従って AD-7999、W-90144、U-6443 と O2 の O 抗原因子は完全に一致することが示され、化学型 II に属する AD-7999、W-90144、U-6443 の血清型は O2 であることが示された。

同様に、強い血清学的交叉反応原性が認められた O4 と X-3972 に対する抗血清をそれぞれ X-3972 と O4 の菌体で吸収した吸収抗血清は、ともに X-3972 と O4 の両 LPS 感作血球に対する溶血活性が完全に消失していた (Table 1-10)。この結果は、X-3972 と O4 のもつ O 抗原因子は完全に一致することを示しており、従って X-3972 の血清型は O4 であることが明らかとなった。

Table 1-6. Fifty percent passive hemolysis titers of absorbed antisera against *V. parahaemolyticus* AD-7999

Antigen (LPS)	Anti-AD-7999 antiserum			
	Non-absorbed	Absorbed with		
		O2	W-90144	U-6443
O2	11,100	-	-	-
O5	312	-	-	-
O11	2,900	-	-	-
AD-7999	15,400	-	-	-
W-90144	11,600	-	-	-
U-6443	13,300	-	-	-
90A-6611	1,310	-	-	-
KX-V212	1,600	-	-	-

- : less than 200

Table 1-7. Fifty percent passive hemolysis titers of absorbed antisera against *V. parahaemolyticus* W-90144

Antigen (LPS)	Anti-W-90144 antiserum			
	Non-absorbed	Absorbed with		
		O2	AD-7999	U-6443
O2	20,800	-	-	-
O5	3,700	-	-	-
O11	3,100	-	-	-
O13	1,200	-	-	-
AD-7999	58,800	-	-	-
W-90144	37,500	-	-	-
U-6443	25,600	-	-	-
KX-V212	1,970	-	-	-

- : less than 200

Table 1-8. Fifty percent passive hemolysis titers of absorbed antisera against *V. parahaemolyticus* U-6443

Antigen (LPS)	Anti-U-6443 antiserum			
	Non-absorbed	Absorbed with		
		O2	AD-7999	W-90144
O2	29,400	-	-	-
O3	773	-	-	-
O5	2,110	-	-	-
O11	3,810	-	-	-
O13	4,370	-	-	-
AD-7999	31,500	-	-	-
W-90144	38,800	-	-	-
U-6443	38,800	-	-	-
AK-33473	606	-	-	-
90A-6611	5,970	-	-	-
KX-V212	2,600	-	-	-

- : less than 200

Table 1-9. Fifty percent passive hemolysis titers of absorbed antisera against *V. parahaemolyticus* O2

Antigen (LPS)	Anti-O2 antiserum			
	Non-absorbed	Absorbed with		
		AD-7999	W-90144	U-6443
O2	1,380	-	-	-
AD-7999	2,560	-	-	-
W-90144	726	-	-	-
U-6443	882	-	-	-

- : less than 200

Table 1-10. Fifty percent passive hemolysis titers of absorbed sera against *V.parahaemolyticus* O4 and X-3972

Antigen (LPS)	Anti-O4 serum		Anti-X3972 serum	
	Non-absorbed	Absorbed with X-3972	Non-absorbed	Absorbed with O4
O4	1,450	-	31,300	-
X-3972	2,070	-	36,200	-

- : less than 200

化学型 III に属する AK-33473 の抗血清を O5 菌体で吸収すると O8 および AK-33473 LPS 感作血球に対する溶血活性が残り、さらに O8 菌体で吸収すると AK-33473 LPS 感作血球に対する溶血活性のみが少量ながら残存した (Table 1-11)。従って、AK-33473 菌株は O5 に共通するエпитープと O8 に共通するエпитープをもつものの、少量ながら本菌株に特異的な抗原因子を含むものと考えられた。

Table 1-11. Fifty percent passive hemolysis titers against *V.parahaemolyticus* OUT AK-33473

Antigen (LPS)	Anti-AK33473 serum		
	Non-absorbed	Absorbed with	
		O5	O5, O8
O5	1,310	-	-
O6	305	-	-
O8	761	297	-
O9	611	-	-
O11	1,380	-	-
AD-7999	1,450	-	-
AK-33473	6,720	381	232
90A-6611	200	-	-

- : less than 200

一方、同じく化学型 III に属する 90A-6611 に対する抗血清を O2 菌体で吸収した吸収抗血清は 90A-6611 と KX-V212 LPS 感作血球に対してのみ溶血活性を示し、その他の LPS 感作血球に対する溶血活性は完全に消失した (Table 1-12)。さらに、この吸収抗血清は KX-V212 菌体で吸収するとすべての LPS 感作血球に対する溶血活性が消失した。従って、90A-6611 株は既知血清型には存在しない本菌株に特異的な抗原因子を含むこと、およびその抗原因子は KX-V212 のもつ抗原因子と共通であることが強く示唆された。

Table 1-12. Fifty percent passive hemolysis titers of absorbed antisera against *V. parahaemolyticus* 90A-6611

Antigen (LPS)	Anti-90A-6611 antiserum			
	Non-absorbed	Absorbed with		
		O2	O2, KX-V212	KX-V212
O2	6,860	-	-	-
O6	459	-	-	-
O11	429	-	-	-
O13	492	-	-	-
AD-7999	10,800	-	-	-
W-90144	7,350	-	-	-
U-6443	9,050	-	-	-
AK-33473	360	-	-	-
90A-6611	22,300	7,350	-	-
KX-V212	14,700	3,940	-	-

- : less than 200

Table 1-13. Fifty percent passive hemolysis titers of absorbed antisera against *V. parahaemolyticus* KX-V212

Antigen (LPS)	Anti-KX-V212 antiserum					
	Non-absorbed	Absorbed with				
		O2	O2, 90A-6611	O5	O5, O2	90A-6611
O2	6,860	-	-	1,970	-	-
O3	264	-	-	-	-	-
O5	1,970	-	-	-	-	-
O6	348	-	-	-	-	-
O11	773	-	-	-	-	-
AD-7999	19,400	-	-	1,090	-	-
W-90144	15,800	-	-	1,130	-	-
U-6443	11,100	-	-	1,550	-	-
AK-33473	1,390	-	-	-	-	-
90A-6611	67,600	5,380	-	13,700	1,260	-
KX-V212	25,600	4,370	-	7,880	800	-

- : less than 200

抗 KX-V212 抗血清においても Table 1-13 に示した様に、O2 菌体で吸収した吸収抗血清は KX-V212 と 90A-6611 LPS 感作血球に対する溶血活性のみが残存し、その他の LPS 感作血球に対する溶血活性はすべて消失した。この吸収抗血清はさらに 90A-6611 菌体で吸収することにより、すべての溶血活性が消失した。また、抗 KX-V212 抗血清を 90A-6611 菌体で直接吸収した吸収抗血清もすべての LPS 感作血球に対する溶血活性が消失した。さらに抗 KX-V212 抗血清の場合、比較的強い血清学的交叉反応原性が認められた O5 の菌体で吸収した吸収抗血清は、化学型 II に属する菌株 (O2、AD-7999、W-90144、U-6443) の LPS 感作血球に対する溶血活性と 90A-6611、KX-V212 LPS 感作血球に対する溶血活性は残存した。この吸収抗血清を O2 菌体で吸収すると、90A-6611 と KX-V212 LPS 感作血球に対する溶血活性のみが残存した。

以上の結果を Table 1-14 に要約した。7 種の OUT 菌株のうち化学型 IV に属する X-3972 の血清型は明らかに O4 であり、また化学型 II に属する W-90144、U-6443 および AD-7999 の血清型はいずれも O2 であることが示された。一方、AK-33473、90A-6611 および KX-V212 はそれぞれ既知の血清型には存在しない特異的な抗原因子をもつことが示された。さらに 90A-6611 と KX-V212 の O 抗原 (LPS) のもつ O 抗原因子は一致し、従来報告されていない血清型で、同一の血清型に属することが明らかとなった。吸収血清を用いた PH 試験において得られた以上の結果は加熱死菌体を用いる菌体凝集反応によっても確認された。

Table 1-14. Serotype of *V.parahaemolyticus* OUT strains

Strain No.	Chemotype	Serotype
X-3972	IV	O4
AD-7999	II	O2
W-90144	II	O2
U-6443	II	O2
AK-33473	III	Serovar of O5 and O8 (?)
90A-6611	III	New
KX-V212	III	New

考察

腸炎ビブリオの菌種同定には通常の生物学的性状検査の他に *toxR* 遺伝子型別検査が行われている。*toxR* 遺伝子は当初 *Vibrio cholerae* の cholerae toxin 制御遺伝子として見出された遺伝子であるが、この遺伝子は多くの enteric mucosal pathogen の DNA に構成的に保持されていることが明らかにされており [24]、現在ではそれらの菌種同定に利用されている [25]。特に腸炎ビブリオは *Vibrio alginolyticus* と生物学的に類似した性状を有しており *toxR* 遺伝子型別検査は非常に有効である。本研究で用いた 7 種の菌株はすべて腸炎ビブリオの *toxR* 遺伝子が検出されており、遺伝学的に腸炎ビブリオであることが確認されている。しかし病原因子毒素とされている TDH の遺伝子では違いがみられ、5 菌株が *tdh* 遺伝子を有しているのに対して 2 菌株からは検出されなかった。7 種の菌株はいずれも下痢症患者の糞便または受傷者の化膿巣から分離されたものでヒトに病原性を示すと考えられることから、すべての病原性腸炎ビブリオが TDH、TRH を産生するわけではなく、本菌感染症にはその他の病原因子が関与していると考えられる。

7 種の OUT 菌株から分離精製した LPS は SDS-PAGE において、Iguchi らが既知血清型腸炎ビブリオの LPS について報告しているように [23]、いずれも低分子の糖鎖で構築される、いわゆる LOS 型の LPS であった。また、これらの LPS の糖組成を検討した結果、すべての LPS がその糖組成に基づく化学分類において既知血清型 LPS の 10 種の化学型のいずれかに分類され、これら 7 種の OUT 菌株の中には、既知血清型 LPS の構成糖と異なる糖成分を含むものは見出されなかった。さらに、常法では Kdo が検出されず、Kdo はリン酸化された Kdo-リン酸として検出された。以上の化学的性状は従来報告されている腸炎ビブリオ LPS の化学的性状 [14, 15, 17, 20, 23] と一致するものであり、これら 7 種の OUT 菌株は LPS の化学的性状においても腸炎ビブリオであることが確認された。一方、90A-6611 および KX-V212 の LPS は同じ化学型に属する既知血清型の LPS と比較してウロン酸含量が高いこと、L,D-Hep が通常の中性糖の分析条件では検出されにくいことなど特徴的な性状を示し、既知血清型 LPS とは異なる構造を持つことが予測された。

腸炎ビブリオは他の菌種と比較して血清型別困難な OUT 菌株が分離されることが多いが、疫学的にこのような菌株の血清型が詳細に検討されることは少ない。そこで本研究ではこれら OUT 菌株の血清型別を従来の菌体凝集反応ではなく、O 抗原そのものである LPS を用いる血清反応によって検討した。分離精製した LPS を感作抗原として用いる PH 試験では、7 種の OUT 菌株のうち 4 菌株については

既知血清型であることが明瞭に示された。すなわち、これまでに OUT 菌株として処理されてきた菌株の中には、本研究で用いた方法によって血清型別できる菌株が含まれている可能性が大きく、これまでに分離された OUT 菌株については再度血清型別が行われるべきであると思われる。本研究で O2 または O4 と同定された OUT 菌株が患者より分離された当初において、菌体凝集反応によって血清型別が困難だった理由については定かではないが、おそらく菌体表層に存在する莢膜などの影響により明瞭な凝集を示さなかったことが原因だと考えられる。一方、OUT の 3 菌株については、それぞれの LPS に特異的な抗原因子をもつことが明らかとなった。これらのうち AK-33473 の LPS は、既知血清型 O5 および O8 LPS と共通の抗原因子を持つが、本菌株に特異的な抗原因子も存在することが示された。しかしながら、その特異的抗原因子の発現量は吸収血清を用いる PH 試験において観察された限りでは極めて低く、本菌株は O5 と O8 の亜種とするのが妥当であると考えられる。一方、90A-6611 および KX-V212 菌株の LPS は従来の既知血清型 LPS には存在しない特異的な主要抗原因子をもち、明らかに新しい血清型であると考えられる。KX-V212 菌株は感染源は恐らく Myanmar であると考えられる旅行者から、関西国際空港において 1996 年に分離された。一方、これと同じ血清型である 90A-6611 は 1990 年に米国において創傷の感染部から分離されたものである。このことは本新血清型株が以前より世界的に分布し、腸炎ビブリオ感染症に関わっていたことを示しており、本研究で用いた OUT 分離菌株以外のものについてもその存在を再度検討する必要がある。さらに今後、分離菌株の血清型別には、この新血清型抗血清も使用されるべきであろう。

第2章 腸炎ビブリオ O2 および KX-V212 の LPS 構成成分として見出された未同定物質の同定

腸炎ビブリオ O2 の LPS を 5 % 酢酸で部分加水分解すると、Folin 反応に陽性を示す未知物質 (O2-FP) が遊離された。KX-V212 LPS から同様の処理によって、類似の未知物質 (OUT-FP) が遊離されることが見出された。これらの物質は腸炎ビブリオの他の血清型 LPS からは得られず、従って、O2 と KX-V212 両菌株の LPS の血清学的特異性を発現するエピトープに関与していると考えられる。そこで本章では両 LPS から分離、精製したこれら FP の同定を試みた。

2-1. FP の分離と精製

O2 LPS を 5 % 酢酸で 100 °C、1.5 時間加水分解した産物の Sephadex G-25 ゲルクロマトグラフィーでは、Fig. 2-1 に示したように 3 つの画分が分離された。OS は LPS の lipid A を除く多糖部、MS は加水分解によって遊離された単糖 (主に GalA) およびリン酸画分にそれぞれ相当し、O2-FP はこれら両画分の中間に溶出された。また、KX-V212 LPS から同様の処理によって O2-FP とほぼ同じ位置に OUT-FP が溶出された。これらの FP はさらに HPLC によって精製し、構造解析を行った。

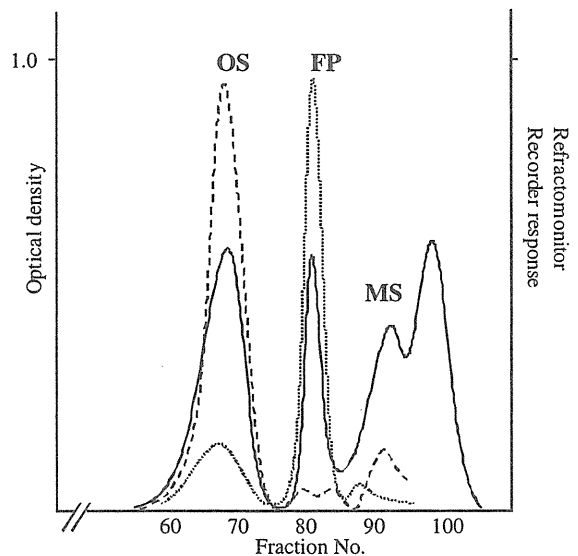


Fig. 2-1. Sephadex G-25 gel-chromatography of degraded polysaccharide fraction of *V. parahaemolyticus* O2 LPS. OS: oligosaccharide fraction, MS: monosaccharide fraction, FP: Folin reaction positive fraction.Folin reaction (750 nm) --- Total carbohydrate (490 nm) — Refractomonitor Recorder response

Table 2-1. ¹H-NMR data for NonIA isolated from LPS of *V. parahaemolyticus* O2-FP and OUT-FP

	Chemical shift, ppm ($J_{H,H}$, Hz) for												
	H-3ax ($J_{3ax,4}$)	H-3eq ($J_{3ax,3eq}$)	H-4 ($J_{3eq,4}$)	H-5 ($J_{4,5}$)	H-6 ($J_{5,6}$)	H-7 ($J_{6,7}$)	H-8 ($J_{7,8}$)	H-9 ($J_{8,9}$)	5NAc	7NAc	H-2Ala ($J_{2,3}$)	H-3Ala	AlaNAc
O2 NonIA	1.85 (11.3)	2.28 (12.8)	3.96 (4.9)	3.71 (10.1)	4.28 (10.4)	3.88 (2.1)	3.84 (8.9)	1.15 (6.1)	1.98	2.00			
OUT NonIA	1.84 (11.6)	2.28 (12.8)	3.97 (4.9)	3.64 (10.1)	4.31 (10.4)	3.87 (1.5)	3.84 (10.7)	1.08 (5.8)	2.00		4.27 (7.3)	1.41	2.00

Samples were dissolved in D₂O.

Acetone (δ_H 2.225 ppm) was used as an internal reference.

Table 2-2. ¹³C-NMR data for NonIA isolated from LPS of *V. parahaemolyticus* O2-FP and OUT-FP

	Chemical shift, ppm for													
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	5(NAc)	7(NAc)/ C-1Ala	C-2Ala	C-3Ala	AlaNAc
O2 NonIA	175.5	96.9	40.9	68.6	53.9	70.9	54.4	67.6	20.4	23.4 175.2	23.0 175.0			
OUT NonIA	175.12	96.7	40.3	68.7	53.8	70.5	54.4	67.4	20.5	23.3 175.06	176.0	51.0	18.1	22.8 175.0

Samples were dissolved in D₂O.

Acetone (δ_C 31.45 ppm) was used as an internal reference.

2-2. FP の NMR 解析

精製した O2-FP の ^1H - および ^{13}C -NMR データを Table 2-1、2-2 に示した。それぞれのスペクトルのシグナルは PDQF-COSY、PHSQC、HMBC および Gated ^{13}C -NMR を用いて帰属した。その ^{13}C -NMR (Fig. 2-2) スペクトルを解析した結果、各々 1 種類の anomeric carbon、methylene carbon および methyl carbon が確認された。また、50 ppm 付近に 2 本の carbon シグナル (53.9 および 54.4 ppm) が、70 ppm 付近には 3 本の carbon シグナル (67.6-70.9 ppm) が観測された。さらに 1 種類の carboxyl 基 (175.5 ppm) と 2 種類の *N*-アセチル基 (methyl 基: 23.0, 23.4 ppm; carbonyl 基: 175.0, 175.2 ppm) の存在も観察された。O2-FP の ^1H -NMR スペクトルでは、methylene 基の proton として 1.85 ppm (axial) と 2.28 ppm (equatorial) に 2 本のシグナルが観測されたが、これは methylene 基の proton が構造上固定された状態で存在することを示しており、本物質が環状構造を持つことを示していた。

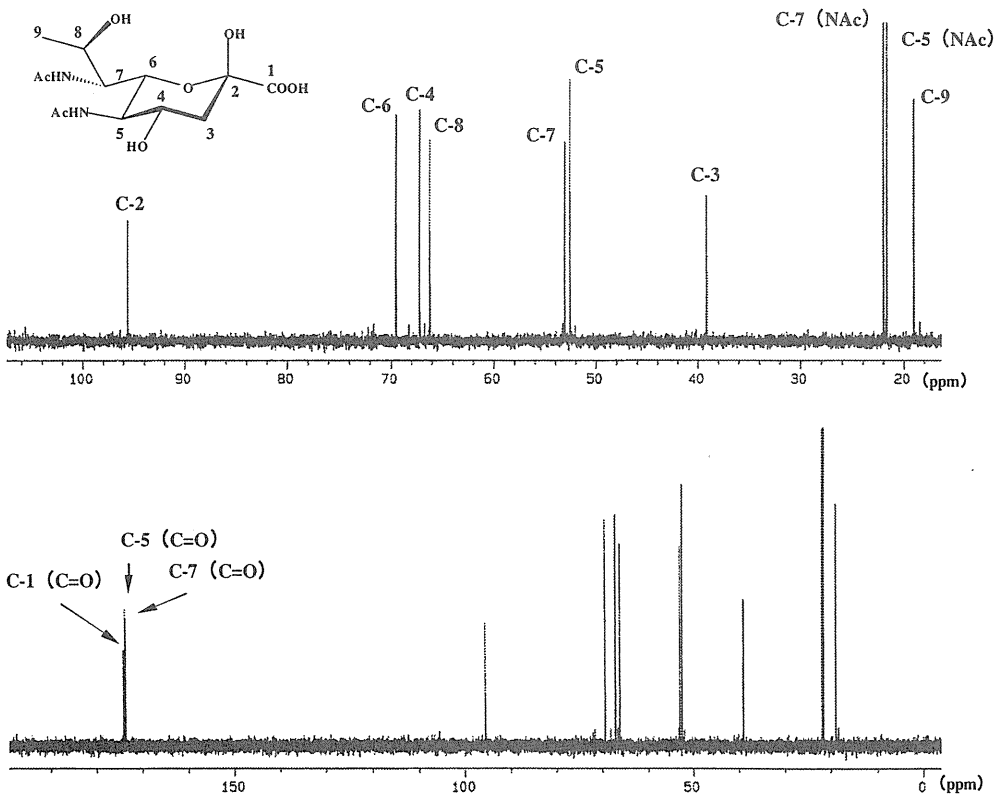


Fig. 2-2. ^{13}C -NMR spectrum of O2 NonlA isolated from *V. parahaemolyticus* O2 LPS.

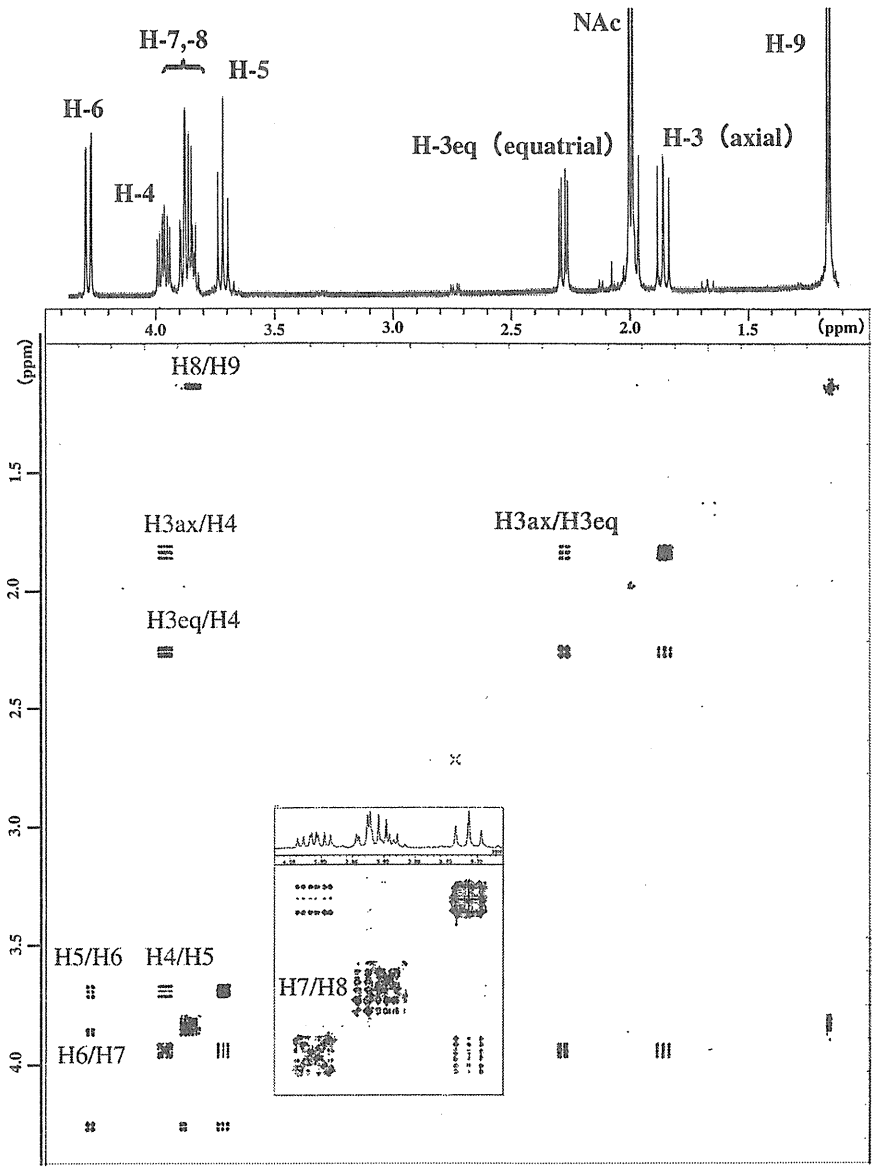


Fig.2-3. PDQF-COSY spectrum of O2 NonIA isolated from *V. parahaemolyticus* O2 LPS.

また 3 本の methyl 基のシグナルが観測されたが、1.98 ppm と 2.00 ppm のシグナルは通常の methyl 基と比較して低磁場にシフトしていることから、*N*-アセチル基を構成する methyl 基に相当することが示唆された。各 carbon に結合する proton の帰属は PDQF-COSY スペクトル (Fig. 2-3) によって行った。さらに coupling 定数 $J_{3ax,4}$, $J_{4,5}$ および $J_{5,6}$ (11.3, 10.1 and 10.4 Hz) の値から H-4、H-5 および H-6 の proton は axial orientation であることが明らかとなった。O2-FP の HMBC では H-5 および H-7 は *N*-アセチル基の carbonyl 基に対して強い correlation を示したことから、アミノ基は C-5 および C-7 位に結合していることが明らかとなり、さらに H-3 は, anomeric carbon (96.9 ppm) および carboxyl carbon (175.5 ppm) との間でそれぞれ correlation が観察された。PHSQC (Fig. 2-4) および Gated ^{13}C -NMR によって anomeric carbon が 4 級炭素であること、C-9 位が methyl 基であることが明らかとなった。従って、この物質は 5,7-diamino-3,5,7,9-tetra-deoxy-non-2-ulosonic acid (NonIA) であり、その 5 位と 7 位のアミノ基がアセチル化された 5,7-di-(*N,N'*-di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-non-2-ulosonic acid であることが明らかとなった。

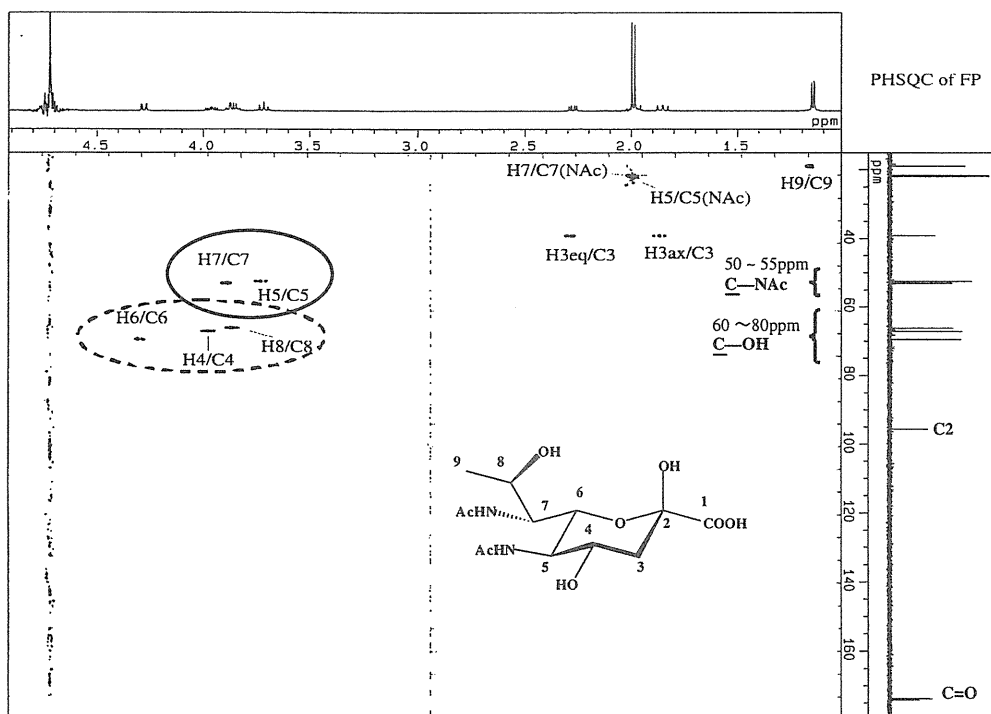


Fig. 2-4. PHSQC spectrum of O2 NonIA isolated from *V. parahaemolyticus* O2 LPS.

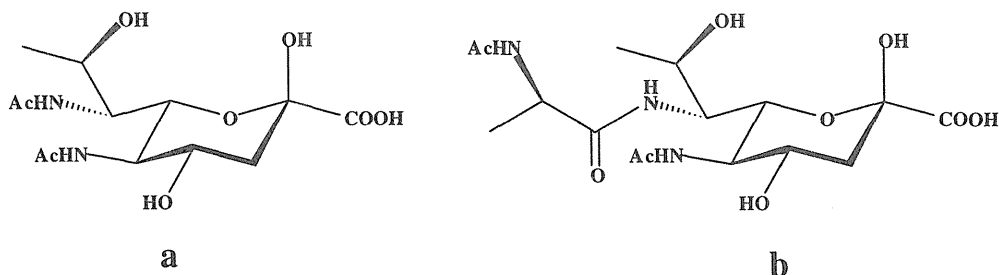


Fig. 2-5. Structures of non-2-ulosonic acids detected in LPS of *V. parahaemolyticus*.

a) 5,7-di-(*N,N'*-di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid isolated from O2 LPS.

b) 5-(*N*-acetyl)-amino-7-[*N*-(*N*-acetyl)-D-alanyl]-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid isolated from KX-V212 LPS.

Non1A には立体配座の相違に基づく多数の異性体が存在する。Tsvetkov ら [26] は 9 種類の異性体を合成し、それらの詳細な NMR データを報告した。そこで O2 LPS 由来の Non1A (O2 Non1A) の立体配座を決定するために、その NMR データをこれら 9 種類の合成 Non1A の NMR データと比較検討した。その結果、O2 Non1A の NMR データは合成された *D-glycero-D-galacto* 配座のものとはほぼ一致しており、他の異性体とは明確に区別できることが明らかとなった。まず、O2 Non1A では *L*- および *D-glycero-L-altro* 異性体と比べ、H-6 のシグナルは 0.37-0.41 ppm 低磁場に、C-6 は 2.8-4.8 ppm 高磁場にシフトしており両者を完全に区別することができた。さらに O2 Non1A の $J_{7,8}$ (8.9 Hz) は *D*- および *L-glycero-L-altro* 異性体の $J_{7,8}$ (< 1 および 5.8 Hz) と比較して高値を示し、*L*-、*D-glycero-D-galacto* 異性体のそれ (8.9 Hz) と一致した値であった。また O2 Non1A の C-6 および C-8 のシグナルはそれぞれ 70.9、67.6 ppm に観測されたが、これは *L-glycero-D-galacto* 異性体のそれらと比較して約 2.0 ppm 高磁場にシフトしていた。O2 Non1A の NOESY スペクトルにおいて、H-6 と H-8 の間に強い correlation が観察された。この correlation は *L-glycero-D-galacto* 異性体では現れず、*D-glycero-D-galacto* 異性体に特徴的な NOE 効果であることから [26]、O2 Non1A は *D-glycero-D-galacto* 配座を持つことが示された。NMR による以上の解析結果から、O2 Non1A は 5,7-di-(*N,N'*-di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid であると同定された (Fig. 2-5-a)。精製した O2 Non1A 標品中の α -、 β - 異性体の存在比は 1:16 (w/w) であった。

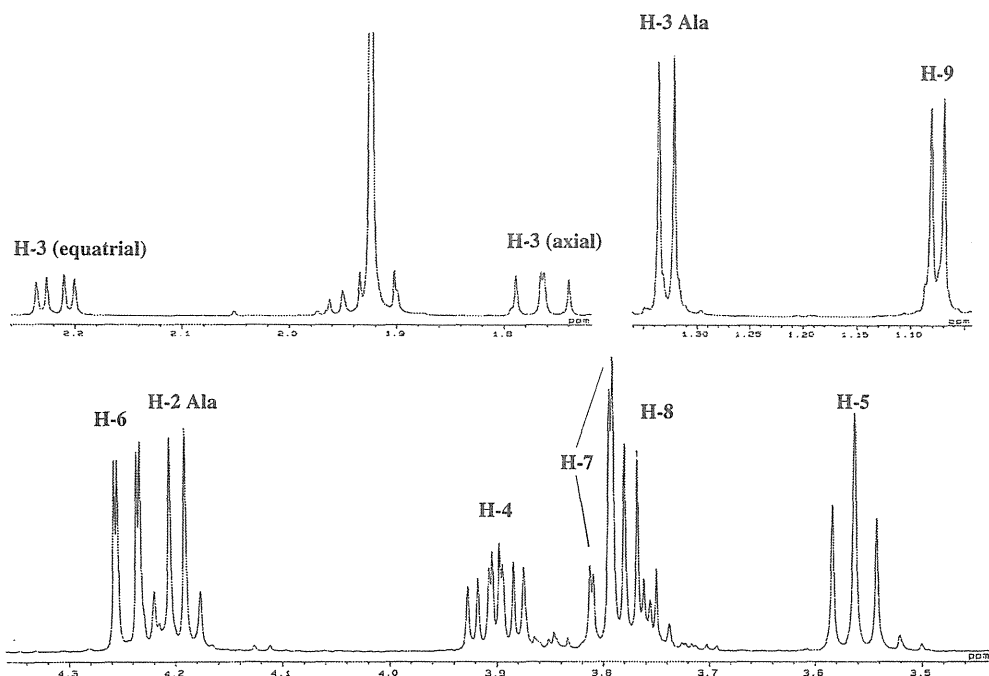


Fig. 2-6. ¹H-NMR spectrum of OUT NonIA isolated from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

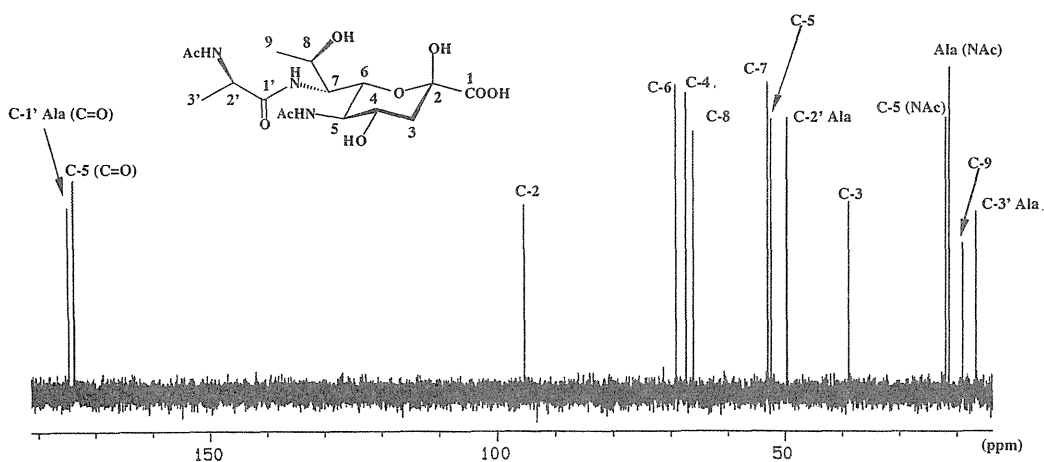


Fig. 2-7. ¹³C-NMR spectrum of OUT NonIA isolated from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

KX-V212 LPS から分離精製した OUT-FP の ^1H - (Fig. 2-6) および ^{13}C -NMR (Fig. 2-7) スペクトルは O2 NonIA と同様に PDQF-COSY (Fig. 2-8)、PHSQC (Fig. 2-9)、HMBC および Gated ^{13}C -NMR を用いて帰属した。その結果、OUT-FP の NMR データは O2 NonIA について測定されたものと非常に類似していたが (Table 2-1, 2-2)、その C-7 位のアミノ基に存在する置換基に由来するシグナルが観測された。すなわち、本物質 OUT NonIA も基本構造は NonIA であることが示唆された。

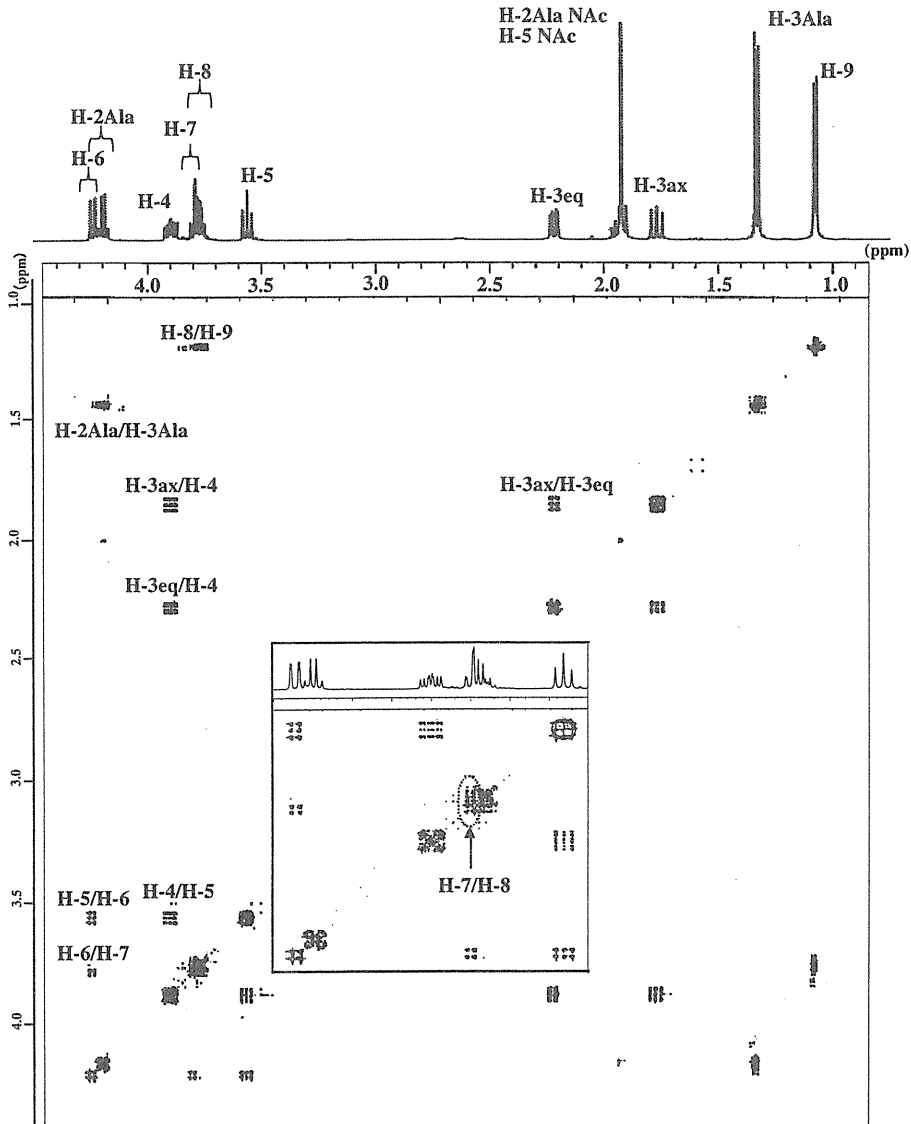


Fig. 2-8. PDQF-COSY spectrum of OUT NonIA isolated from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

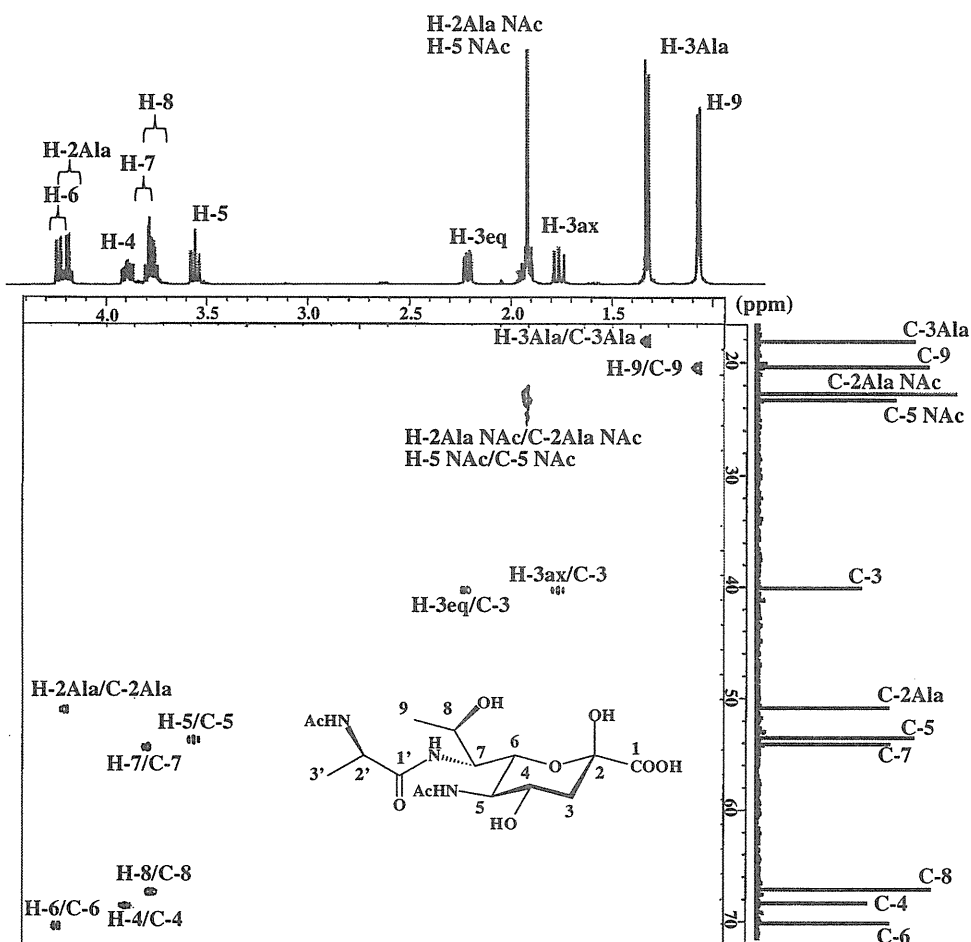


Fig. 2-9. HSQC spectrum of OUT NonIA isolated from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

OUT NonIA の C-7 位のアミノ基に存在する置換基を解明する目的で FAB-MS (positive ion mode) による分子量測定を行った。その結果、OUT NonIA の分子量は MW 405 であり O2 NonIA (MW 334) のそれと比較して 71 Da 大きく、この分子量の差はアセチル基と *N*-アセチル Alanyl 基の差に相当するものであった。そこで OUT NonIA を加水分解後、amino acid analyzer によって分析した結果、アミノ酸領域には Ala のみが検出された。この Ala の絶対配座を決定するため、標準の L- および D-Ala を使い、それらの *N*-acetyl-S-(+)-2-butylester 誘導体として GC-MS により分析した。その結果、OUT NonIA より得られた Ala 誘導体は標準の D-Ala 誘導体と同一の retention time (7.90min) を示し、標準の L-Ala 誘導体のそれ (8.20min) とは明らかに区別できた。すなわち、OUT NonIA の置換基として存在する Ala は D-Ala

であることが明らかとなった。OUT NonIA の HMBC (Fig. 2-10) スペクトルでは、C-5 に結合した *N*-アセチル基由来の carbonyl 基と H-5 との間、D-Ala C-2' に結合した *N*-アセチル基由来の carbonyl 基と D-Ala H-2' との間に correlation が観察された。さらに、H-7 と D-Ala C-1' との間に強い correlation が観察され、D-Ala が N-7

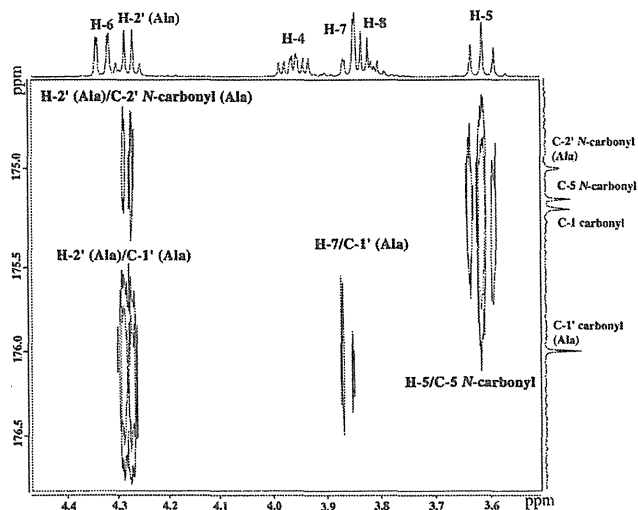


Fig. 2-10. HMBC spectrum of OUT NonIA isolated from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

に結合していることが示された。一方、*N*-脱アシル化後、*N*-アセチル化した KX-V212 LPS から分離、精製した NonIA の ^1H - および ^{13}C -NMR データは O2 NonIA の NMR データと完全に一致した。以上の結果、OUT NonIA は 5-(*N*-acetyl)-amino-7-[*N*-(*N*-acetyl)-D-alanyl]-amino-3,5,7,9-tetradecoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (Fig. 2-5-b) であることが明らかとなった。精製 OUT NonIA 標品中の α - と β -異性体の存在比は 1:32 (w/w) であった。

2-3. O2 および OUT NonIA の GC-MS による分析

O2 NonIA を還元 (NaBD_4) 後、全メチル化した誘導体、すなわち、1,2,4,6,8-penta-*O*-methyl-5,7-dimethylacetamido-3,5,7,9-tetradecoxy-nonitol (1-2D, 2-1D) を GC-MS によって分析した (Fig. 2-11-a)。その結果 EI-MS では、C-1-C-5、C-1-C-7、C-5-C-9、C-6-C-9 および C-7-C-9 にそれぞれ相当するフラグメントイオンピーク、 m/z 235 (66.3)、364 (17.7)、273 (100)、188 (22.1) および 144 (88.4) [括弧内の数値は相対強度 (%), m/z 273=100%] が検出され、また CI-MS では、本誘導体の分子量に相当する分子イオンピーク $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 509 が検出された。さらに OUT NonIA の同誘導体である 1,2,4,6,8-penta-*O*-methyl-5-(*N*-acethylmethyl)-amino-7-[*N*-(*N*-acethylmethyl)-alanyl]-amino-3,5,7,9-tetradecoxy-nonitol (1-2D, 2-1D) を GC-MS により分析した (Fig. 2-11-b)。結果、C-1-C-5、C-1-C-6、C-1-C-7、C-5-C-9 および C-6-C-9 にそれぞれ相当するフラグメントイオンピーク、 m/z 235 (22.7)、279 (6.5)、449 (4.8)、358 (41.6)

および 273 (12.4) (m/z 128=100%) が検出され、CI-MS において本誘導体の分子量に相当する分子イオンピーク $[M+H]^+$ m/z 494 が検出された。これらの結果は NMR 解析の結果を強く支持するものであった。

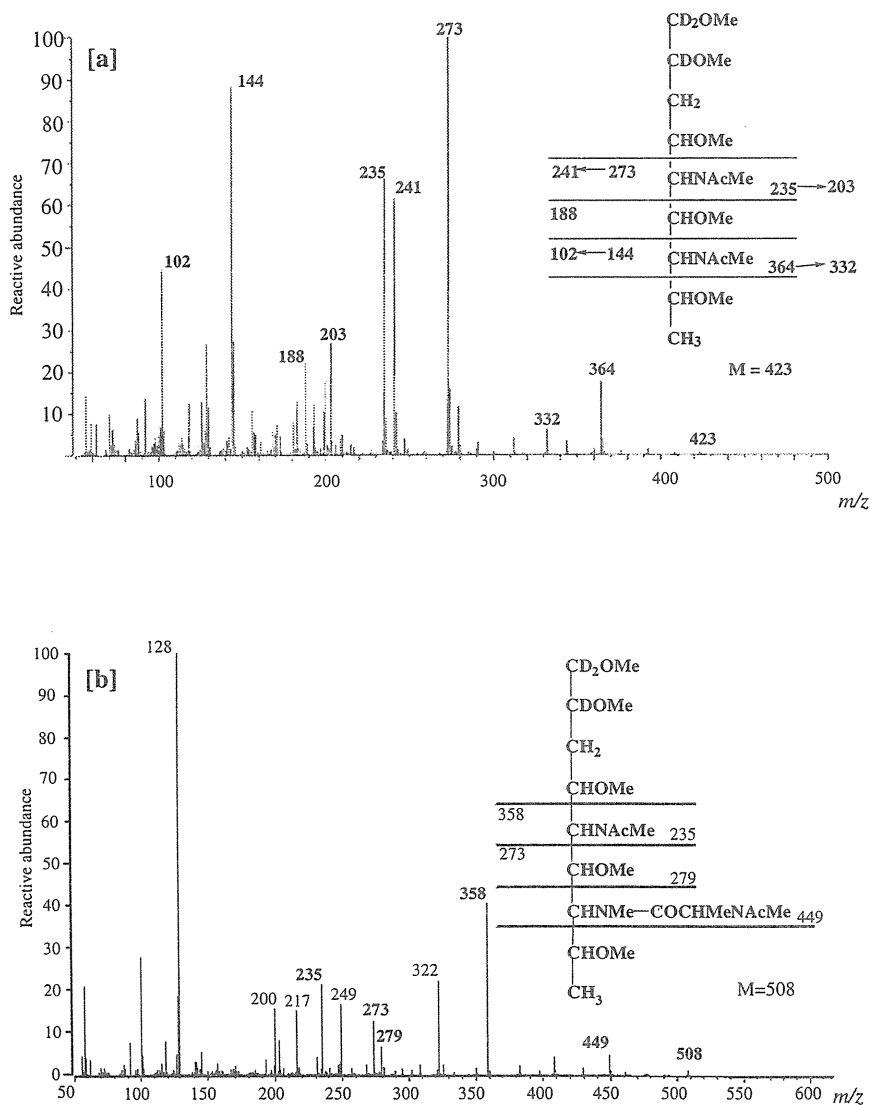


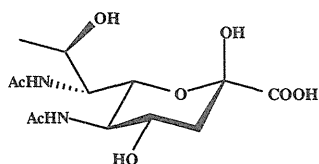
Fig. 2-11. EI-Mass spectra of reduced (NaBD_4) and permethylated derivatives of O2 NonlA and OUT NonlA.

[a]. 1, 2, 4, 6, 8-penta-*O*-methyl-5, 7-di-methylacetamido-3, 9-di-deoxynonitol (1-2D, 2-1D) from O2 NonlA.

[b]. 1, 2, 4, 6, 8-penta-*O*-methyl-5-methylacetamido-7-[*N*-(*N*-methylacetamido)-alanyl] 3,5,7,9-tetra-deoxynonitol (1-2D, 2-1D) from OUT NonlA.

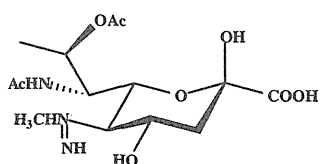
考察

本章では、O2 と KX-V212 の LPS 多糖鎖の構成糖として存在する NonIA の構造解析を行い、それらの立体配座はいずれも D-glycero-D-galacto 異性体であることを明らかにした。Fig. 2-12 に示した様に、これまでいくつかの NonIA 異性体がグラム陰性菌 LPS の構成成分として報告されている [27-39]。またこれら天然由来の NonIA 以外にも 9 種類の NonIA が合成され、それらの詳細な NMR データが報告されている。本研究ではこれらのデータと比較することにより、O2 および KX-V212 の LPS から分離精製した NonIA を同定した。現在までにグラム陰性菌 LPS の構成成分として同定されている NonIA の立体異性体は D-glycero-D-galacto [39]、L-glycero-D-galacto [39]、D-glycero-D-talo [26] および L-glycero-L-manno [27-29] の 4 種である。本研究において腸炎ビブリオの LPS から初めて発見された 2 種類の NonIA は D-glycero-D-galacto 異性体であり、本異性体が検出される菌種としては腸炎ビブリオと同じビブリオ科に属する *V. salmonicida* [33] や *V. alginolyticus* [35] の LPS であることは、これらの菌種における遺伝学的類似性を示しており興味深い。またそのアミノ基に結合するアセチル基以外の置換基としては、N-5 に 3-hydroxybutyl 基が結合している NonIA (*A. baumannii* O24 [34], *P. fluorescens* [32], *L. pneumophila* [30, 31] and *V. salmonicida*[33]) や、N-5 の acetamidino 基 (*L. pneumophila* [30, 31])、N-7 の formyl 基 (*P. aeruginosa* O5 [40]) が報告されている。腸炎ビブリオ O2 LPS から分離された NonIA は N-5 および N-7 にはアセチル基が結合していたが、KX-V212 LPS 由来の NonIA では N-7 の置換基として D-alanyl 基が同定された。このようなアミノ酸結合型の NonIA は以前には報告されておらず、本研究で初めて見出された。



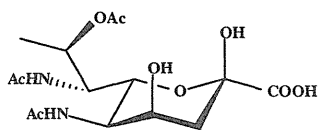
5,7-di-(*N,N'*-di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid

Pseudomonas fluorescens



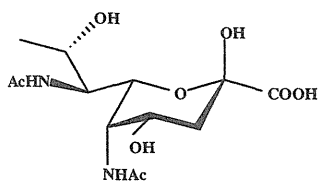
5-*N*-acetyl-imido-7-*N*-acetyl-amino-8-*O*-acetyl-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (Legionaminic acid)

Legionella pneumophila serogroup 1



5,7-di-(*N,N'*-di-acetyl)-amino-8-*O*-acetyl-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-talo-non-2-ulosonic acid (Isolegionaminic acid)

Legionella pneumophila serogroup 1



5,7-di-(*N,N'*-di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulosonic acid (Pseudaminic acid)

Pseudomonas aeruginosa
Shigella boydii

Fig. 2-12. Structures of naturally occurring isomers of 5,7-diamino-3,5,7,9-tetra-deoxy-non-2-ulosonic acid.

第3章 腸炎ビブリオ O2 LPS 多糖鎖の構造解析

腸炎ビブリオでは、13種の血清型 LPS のうち、これまでに LPS 多糖鎖の構造解析がなされたのは O12 LPS のみである。本章では腸炎ビブリオの全血清型 LPS についてその多糖鎖の構造を解明するための一環として、O2 の LPS 多糖鎖の構造解析を行った。O2 は本研究で明らかにされた新血清型株 KX-V212 と共通抗原性を示す。

3-1. LPS および化学修飾 LPS の化学分析

Table 3-1 に LPS と、脱リン酸化後、還元および脱アシル化した LPS (deacylated HF-LPSred) の化学糖組成を示した。LPS では構成糖として D-Glc、D-Gal、D-GlcA、L,D-Hep、D,D-Hep、D-GlcN、Kdo および O2 NonIA が検出された。これらの構成糖に加えて、LPS には lipid A を構成する脂肪酸および多量のリン酸が含まれていた。Deacylated HF-LPSred では、すべての脂肪酸とリン酸の大部分が除去され、LPS で検出された構成糖は GalA を除いてすべて検出された。

Table 3-1. Sugar composition of LPS and dephosphorylated, reduced and deacylated LPS (deacylated HF-LPSred) obtained from *V. parahaemolyticus* O2

Component sugar	LPS	Deacylated HF-LPSred
D-Glucose	0.214	0.578
D-Galactose	0.144	0.428
<i>L-glycero-D-manno</i> -heptose	0.018	0.089
<i>D-glycero-D-manno</i> -heptose	0.013	0.123
D-Glucosamine	0.088	0.608
Uronic acid ^{a)}	0.359	0.559
D-Glucuronic acid	+	+
D-Galacturonic acid	+	-
Kdo ^{b)}	+	+
O2 NonIA ^{c)}	+	+
Phosphate	1.329	0.028
3-OH-C12:0	0.072	-
C14:0	0.133	-
3-OH-C14:0	0.155	-
C16:0	0.127	-

a) Values were expressed as $\mu\text{mol} / \text{mg}$ of samples. Uronic acid was estimated by a colorimetric method and the presence of glucuronic and galacturonic acid were confirmed by GC and GC-MS after reduction of their carboxyl groups. b) Kdo was not detected by the periodate-thiobarbituric acid reaction, but its presence was confirmed by GC and GC-MS.

c) 5, 7-di-(*N,N'*-di-acetyl)-amino-3, 5, 7, 9-tetradecoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid.

3-2. TOF-MS および FAB-MS による O2 LPS 多糖鎖の解析

無水ヒドラジン処理による脱 O-アシル化のみを行った LPS (LPS_{OH}) を MALDI-TOF MS (negative ion mode) (Fig. 3-1) によって分析した結果、数個のイオンピークが検出された。これらのうち、最も大きなイオン (m/z 2874.8) は、2 分子ずつの Hex、Hep、HexA および HexN と 1 分子ずつの Kdo および O2 Non1A で構成される糖鎖に 5 分子のリン酸、2 分子ずつの 3-OH-C14:0 およびエタノールアミンが結合した分子 $\text{Hex}_2/\text{Hep}_2/\text{HexA}_2/\text{HexN}_2/\text{Kdo}/\text{O2 Non1A}/\text{P}_5/\text{HOEtN}_2/3\text{-OH-C14:0}_2$ (分子量: 2876.4) の分子イオン $[\text{M-H}]^-$ に相当するものであった。 m/z 2698.8 に検出されたイオンは前者と比べて 176 Da 小さく、これは上記の分子から 1 分子の HexA が失われたものの分子イオン $[\text{M-H}]^-$ に相当していた。その他、これらの両分子からリン酸とエタノールアミンが順次失われた分子に由来する分子イオンピークも検出された。この MALDI-TOF MS による解析の結果、O2 の LPS_{OH} では 10 個の単糖で構成される糖鎖をもつ分子と、これから 1 分子の分子イオン $[\text{M-H}]^-$ に相当するイオンの HexA (恐らくは GalA) が失われた 9 個の単糖で構成される糖鎖をもつものの、2 つの分子が存在することが明らかとなった。また O2 LPS の構成成分としてエタノールアミンも存在していた。

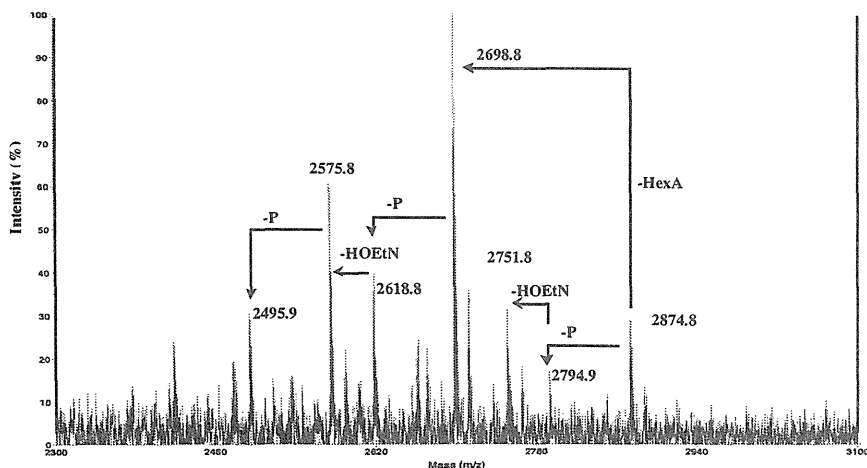


Fig. 3-1. MALDI-TOF Mass spectrum (negative ion mode) of de-O-acylated LPS (LPS_{OH}) from *V. parahaemolyticus* O2. The main ion at m/z 2698.8 corresponds to the calculated molecular weight (2700.3 Da) of nonasaccharide $\text{Hex}_2/\text{Hep}_2/\text{HexN}_2/\text{Kdo}/\text{O2 Non1A}$ containing five moles of phosphate, two moles each of ethanolamine (HOEtN) and 3-OH-C14:0.

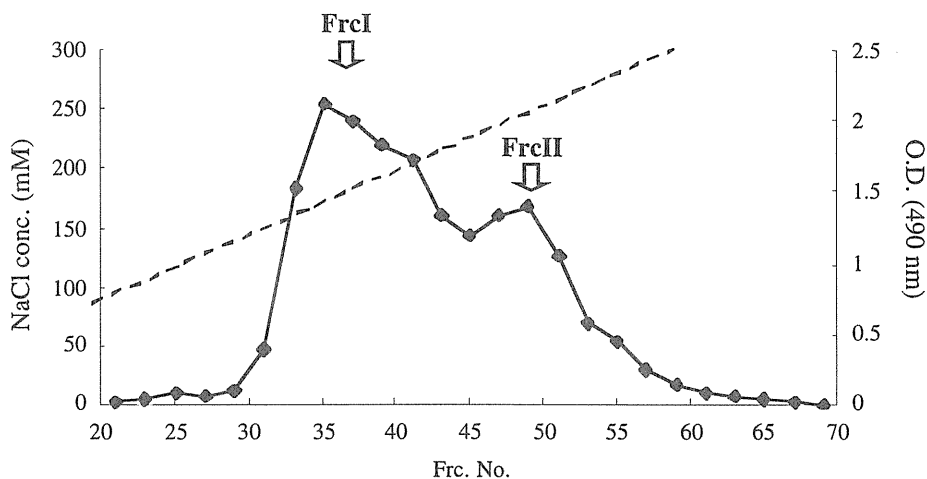


Fig. 3-2. Elution profile of DEAE Sephacel chromatography of deacylated HF-LPSred from *V. parahaemolyticus* O2. The column was eluted with 0 to 500 mM NaCl linear gradient in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5).

次に、O2 LPS の糖以外の構成成分を除去した糖鎖を得る目的で完全脱リンと脱アシル化を行った deacylated HF-LPSred を調製し、その精製を試みた。Deacylated HF-LPSred の DEAE Sephacel chromatography (0~500 mM NaCl) では 157 mM NaCl 付近に major fraction (FrcI) が、250 mM NaCl 付近に minor fraction (FrcII) が溶出された (Fig. 3-2)。この Frc.I を FAB-MS (positive ion mode) によって分析した結果 (Fig. 3-3-a)、2 つの主要 ion peak が検出された。 m/z 1679.6 のイオンは 1 mol ずつの D-glucosaminitol, D-GlcN, Kdo, L,D-Hep, D,D-Hep, D-Glc, D-Gal, D-GlcA および O2 Non1A で構成される nonasaccharide (PS1, 分子量: 1679.5) の分子イオン $[M+H]^+$ に相当し、 m/z 1518.6 のイオンはこれより 161 Da 小さい分子であり、PS1 から D-GlcN が除かれた octasaccharide に由来するものであった。一方、FrcII の FAB-MS (Fig. 3-3-b) で検出された 2 つのイオン (m/z 1759.7 および 1598.7) は、それぞれ 1 分子のリン酸が結合した PS1 と PS2 の分子量 (それぞれ 1759.5, 1598.5) に相当していた。従って、FrcII は HF 処理により完全に脱リン酸を受けなかった糖鎖であることが判明したため、これ以上の解析は行わなかった。

FrcI をさらに highperformance anion-exchange chromatography (HPAEC) によって精製した結果、上記の PS1 と PS2 に相当する 2 つの画分に分画された。得られた PS1 と PS2 の重量比は 5 : 1 であった。

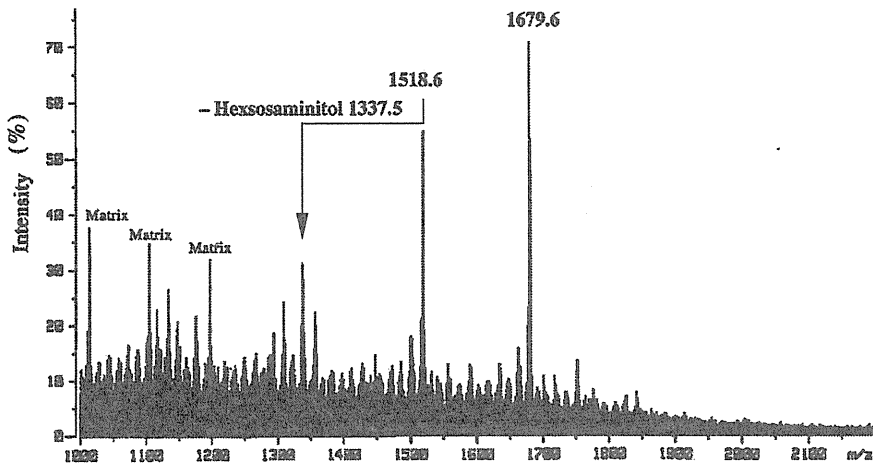


Fig. 3-3-a. FAB Mass spectrum (positive ion mode) of dephosphorylated, reduced and deacylated LPS (FrcI obtained by DEAE-Sephacel chromatography) from *V. parahaemolyticus* O2. The ions $[M+H]^+$ at m/z 1518.6 and 1679.6 correspond to the calculated molecular weight of PS2 and PS1, respectively.

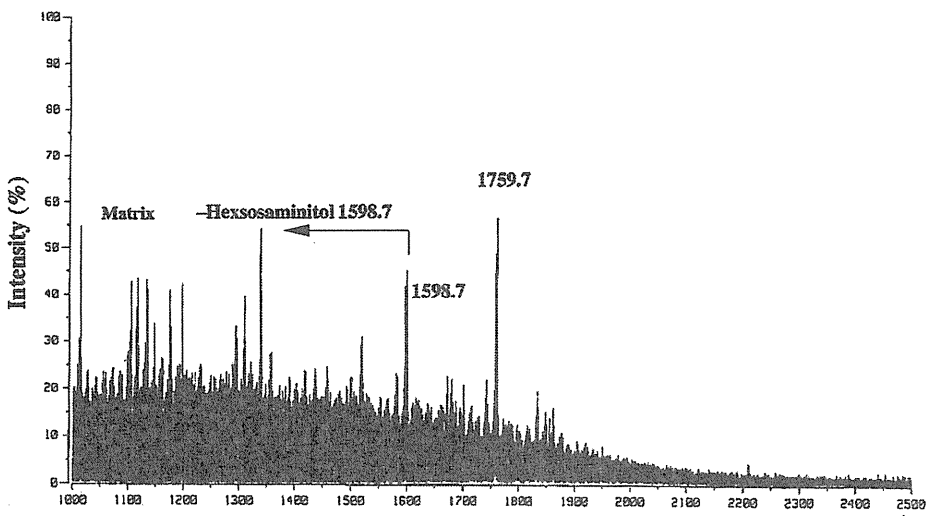


Fig. 3-3-b. FAB Mass spectrum (positive ion mode) of de-phosphorylated, reduced and deacylated LPS (FrcII obtained by DEAE Sephacel chromatography) from *V. parahaemolyticus* O2. The ions $[M+H]^+$ at m/z 1598.7 and 1759.7 correspond to the calculated molecular weight of PS2 and PS1 containing one mol phosphate, respectively.

Table 3-2. ¹H-NMR data of the carbohydrate backbone (PS1) prepared by dephosphorylation and deacylation from *V. parahaemolyticus* O2 LPS

Residue proton	Chemical shifts of the component sugars, ppm ($J_{n,n+1}$)								
	D-Gal	D-Glc	D-GlcA	L,D-Hep	D,D-Hep	Kdo	NonA	D-GlcN	D-glucosaminitol
H-1-a	4.611 (7.3)	4.422 (7.3)	5.093 (3.7)	5.484 (<1)	5.012 (1.4)			4.484 (8.2)	3.769 (6.1; 11.3)
H-1-b									3.882 (3.1)
H2	3.548 (10.1)	3.424 (9.2)	3.600 (9.2)	4.197 (2.8)	4.104 (3.4)			2.757 (9.8)	3.516 (6.1)
H-3 (axial)	3.636 (3.7)	3.548 (10.1)	3.750 (9.6)	4.031 (9.6)	4.132 (10.1)	1.909 (11.9; 12.2)	1.661 (11.9; 12.3)	3.419 (9.2)	4.104 (2.7)
H-3 (equatorial)						2.152 (5.2)	2.858 (4.7)		
H-4	3.910 (<1)	3.773 (10.1)	3.437 (10.6)	3.993 (10.1)	4.125 (10.5)	4.135 (3.7)	3.525 (10.3)	3.445 (9.6)	3.667 (7.3)
H-5	3.657	3.597	4.135	3.646 (3.7)	4.131 (3.7)	4.145 (10.4)	2.957 (10.4)	3.595	3.957
H-6-a	3.662 (11.5)	3.606 (2.4; 12.4)		4.039	4.096	3.719 (8.5)	3.737 (2.1)	3.551 (11.4)	3.820 (6.4; 11.6)
H-6b	3.817	3.950 (5.8)						3.652	4.135 (2.7)
H-7-a				3.691 (7.0; 11.5)	3.716 (12.0)	3.864	3.137 (8.5)		
H-7b				3.807 (4.1)	3.835 (4.6)				
H-8-a						3.652 (6.4; 12.5)	4.042 (6.7)		
H-8b						3.964 (3.7)			
H-9							1.335		

Acetone was used as an internal reference (δ_H 2.225 ppm).

Table 3-3. ^{13}C -NMR data of the carbohydrate backbone (PS1) prepared by dephosphorylation and deacylation from *V. parahaemolyticus* O2 LPS

Residue carbon	Chemical shifts of the component sugars, ppm ($J_{\text{C}_1\text{H}_1}$)								
	D-Gal	D-Glc	D-GlcA	L,D-Hep	D,D-Hep	Kdo	NonIA	D-GlcN	D-glucosaminitol
C-1	102.13 (163)	102.53 (164)	100.72 (171)	99.84 (173)	101.14 (174)	174.40	170.85	102.63 (163)	59.04
C-2	71.26	73.72	74.45	79.65	71.05	99.81	101.06	56.32	55.37
C-3	72.76	74.21	73.25	71.81	74.30	35.10	40.96	73.61	66.12
C-4	68.88	76.11	72.79	67.55	75.84	66.10	69.98	70.57	71.11
C-5	73.61	74.85	72.52	71.03	72.64	75.79	53.45	74.87	70.46
C-6	63.62	71.08	172.30	68.81	69.26	73.07	73.01	62.26	72.13
C-7				61.53	61.39	70.13	55.50		
C-8						63.26	68.79		
C-9							18.42		

Acetone was used as an internal reference (δ_{H} 31.45 ppm).

3-3. NMR による O2LPS 多糖鎖の構造解析

^1H - および ^{13}C -NMR スペクトルは ^1H , ^1H -COSY、TOCSY、NOESY、HMQC および HMBC 測定によって帰属した。PS1 の ^1H - および ^{13}C -NMR スペクトルの測定値を Table 3-2、3-3 に示した。 ^1H -NMR スペクトル (Fig. 3-4) では 4.3 – 5.4 ppm に 6 種類の anomeric proton に由来するシグナルが観察された。これらのシグナルは各構成糖の ring proton シグナルの vicinal coupling constant 値に基づき、それぞれ低磁場側から L,D-Hep、D-GlcA、D,D-Hep、D-Gal、D-Glc および D-GlcN の H-1 に帰属され、すべての糖質は pyranose form であることが明らかとなった。また D-Gal、D-Glc および D-GlcN の $J_{\text{H1,H2}}$ coupling constant 値 (7.3 ~ 8.2 Hz) から、これらの糖残基は β - 配位であり、D-GlcA はその $J_{\text{H1,H2}}$ (3.7 Hz) から α - 配位であることが示された。一方、O2LPS 多糖鎖には 2 種類の Hep が存在するが、これらの Hep はともに D-manno 配位であるためにそのアノマー配位を $J_{\text{H1,H2}}$ 値では決定することができない。そこで Gated ^{13}C -NMR 測定により、 $J_{\text{C1,H1}}$ 値からその決定を試みた。一般的に Gated ^{13}C -NMR 測定により得られる anomeric carbon の $J_{\text{C1,H1}}$ は α - 配位の場合 170-175 Hz であり、 β - 配位では 160-165 Hz であることから、O2LPS 多糖鎖中に存在する Hep はいずれも α - 配位であることが明らかとなった (Table. 3-3)。また Kdo のアノマー配位は H-3 (equatorial) の chemical shift 値、 $J_{\text{H7,H8-a}}$ および $J_{\text{H7,H8-b}}$ の値で区別することができるが [41]、本研究で測定されたそれらの値は明確に Kdo 残基が α - 配位であることを示していた。

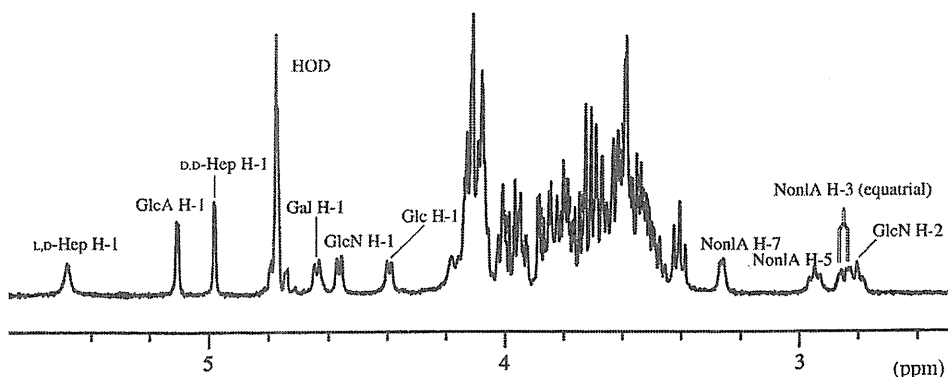


Fig. 3-4. ^1H -NMR (500 MHz) spectrum of PS1 isolated from *V. parahaemolyticus* O2LPS.

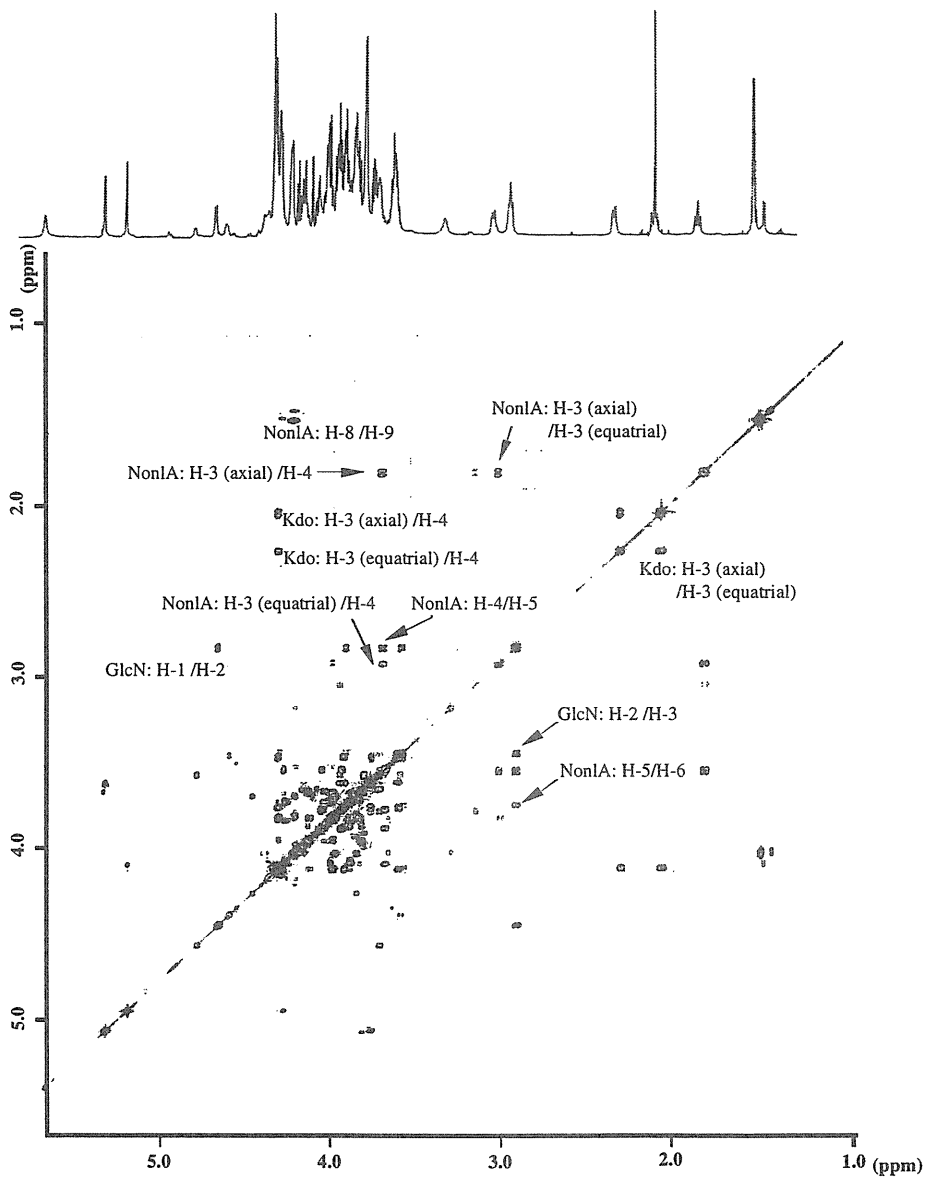


Fig. 3-5. ^1H , ^1H -COSY spectrum of PS1 from *V. parahaemolyticus* O2 LPS (JEOL, ECA-800, 2048 \times 2048 data point).

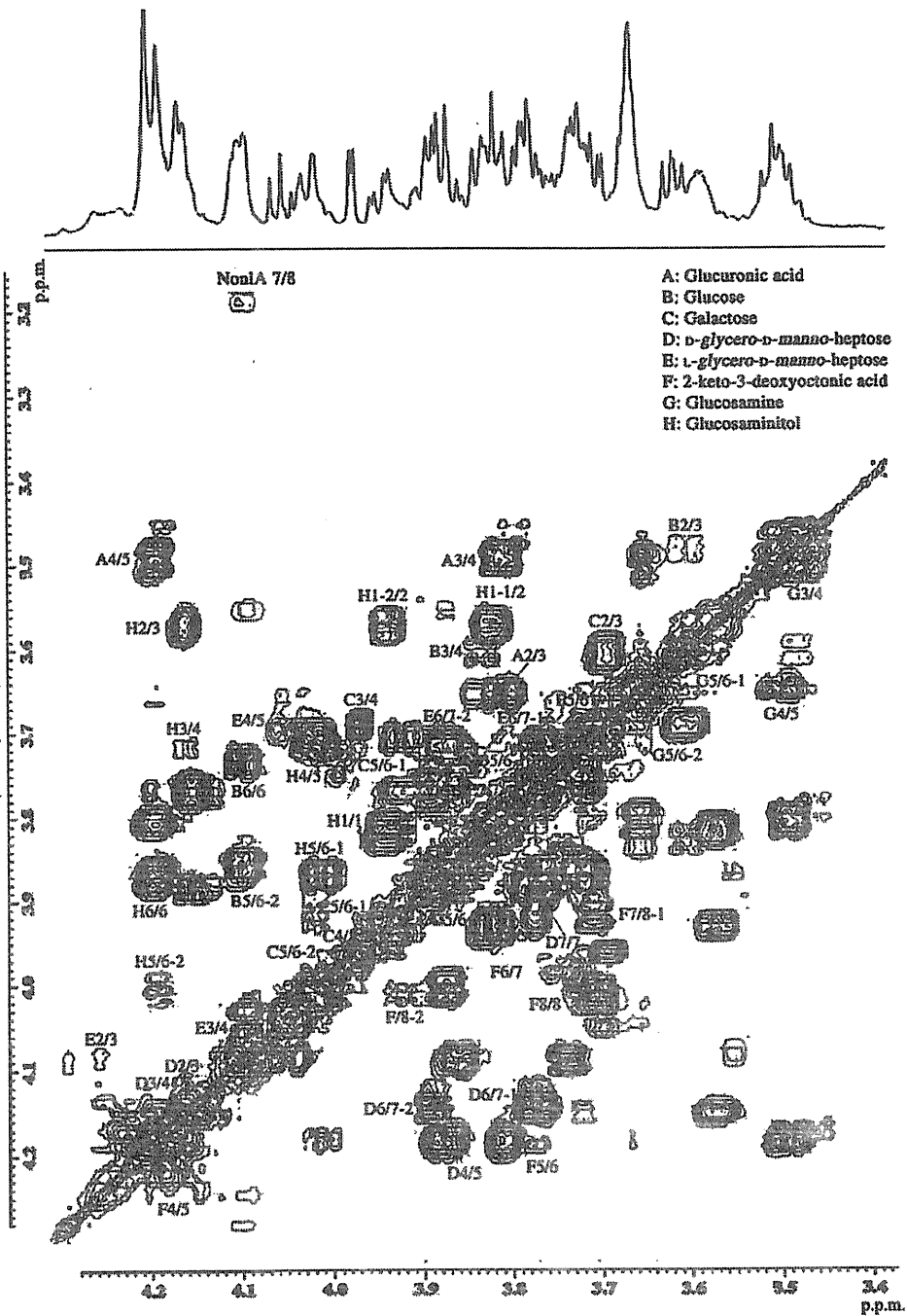


Fig. 3-6. $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY spectrum of PS1 from *V. parahaemolyticus* O2 LPS (JEOL, ECA-800, 2048 \times 2048 data point).

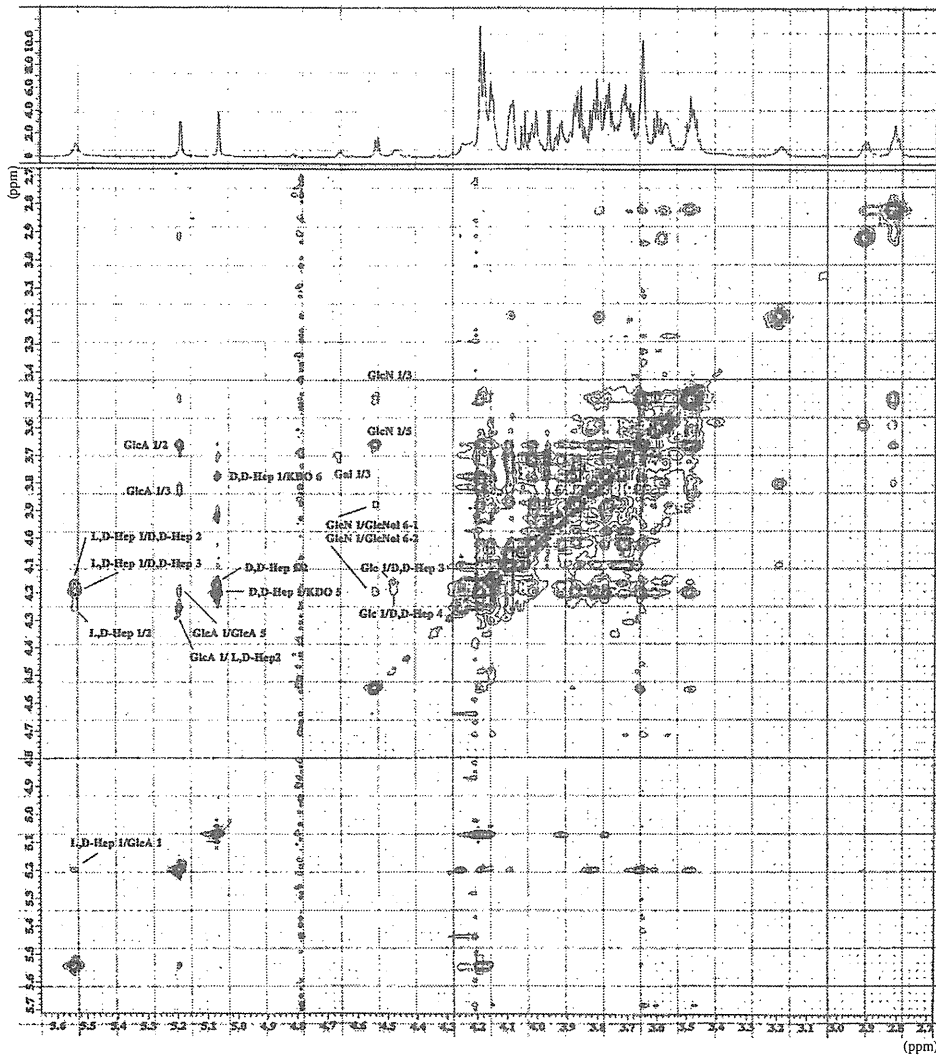


Fig. 3-7. NOESY of PS1 from *V. parahaemolyticus* O2 LPS (JEOL, ECA 800 MHz, zero filled 2048 × 2048 data points).

O2 NonIA のアノマー配位についてはその H-3 (axial) の chemical shift 値が、前章で明らかにした β -配位の H-3 (axial) のそれと比較して 0.58 ppm 低磁場にシフトしていることから、Kdo と同様に α -配位であることが示された。その他のプロトンシグナルの帰属は $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Fig. 3-5, 3-6) に基づいて行った。 ^{13}C -NMR において観測された 2 本のカルボキシルシグナル (174.40 ppm, 170.85 ppm) は HMBC スペクトルにおける correlation からそれぞれ Kdo および OUT NonIA の C-1 に帰属された。同様に 172.30 ppm のカルボキシルシグナルは D-GlcA の C-6 に帰属された。

糖鎖の結合様式は NOESY スペクトル (Fig. 3-7) および HMBC スペクトルの測定によって解析した。PS1 の NOESY スペクトルにおいて、観察された糖残基間の NOE 効果を Table 3-4 に示した。Kdo の H-3 (axial) と D-GlcN の H-6-a、さらに D-GlcN の H-1 と D-glucosaminitol の H-6-a、-b との間にそれぞれ correlation が確認されたことから、PS1 の還元末端部の構造は α -Kdo-(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcN-(1 \rightarrow 6)-D-glucosaminitol であることが明らかとなった。O2 NonIA の H-3 (equatorial) と D-Glc の H-6-b、D-Gal の H-1 と D-Glc の H-4 との間にも NOE 効果がそれぞれ観察されたことから、PS1 は部分構造として β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-[α -NonIA-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Glc-(1 \rightarrow を持つことが明らかとなった。すでに Kondo ら [42] は腸炎ビブリオ O2 LPS には α -D-GlcA-(1 \rightarrow 2)-L- α -D-Hep-(1 \rightarrow 3)-D- α -D-Hep の部分構造が存在することを報告したが、この trisaccharide 構造は本研究で行った NOESY および HMBC スペクトルの解析によって、PS1 に

Table 3-4. Important NOE effects observed in two dimensional NOESY of the carbohydrate backbone (PS1) prepared by dephosphorylation and deacylation from *V. parahaemolyticus* O2 LPS

Residue	Residue proton	Interresidual NOE	
		Sugar residue	Position (Intensity)
β -D-Glc	H-1	D- α -D-Hep	3 (m), 4 (m)
α -D-GlcA	H-1	L- α -D-Hep	1 (w), 2 (s)
L- α -D-Hep	H-1	D- α -D-Hep	2 (m), 3 (s)
		α -D-GlcA	1 (w)
D- α -D-Hep	H-1	α -Kdo	5 (s), 7 (m)
α -Kdo	H-3 (axial)	β -D-GlcN	6-b (w)
α -O2 NonIA	H-3 (equatorial)	β -D-Glc	6-a (w)
β -D-GlcN	H-1	D-Glucosaminitol	6-a (m), 6-b (m)

The intensity of NOE effects were expressed as strong (s), medium (m), weak (w).

においても同様に存在することが確認された。さらに D-Glc の H-1 と D,D-Hep の H-4、および D,D-Hep の H-1 と Kdo の H-5 との間にも NOE 効果がそれぞれ観察された。以上の PS1 の構造解析の結果から、O2 LPS 多糖鎖は Fig. 3-8 に示した構造であることが明らかとなった。ただし、PS1 はその調製過程において還元末端の D-GlcN を還元したため、図示した構造では還元末端の D-glucosaminitol は D-GlcN として表した。

一方、PS2 は ¹H-NMR および FAB-MS による解析の結果、PS1 から GlcN 1 残基が失われた糖鎖であることが判明した。すなわち、PS2 は lipid A backbone の β-D-GlcN-(1→6)-D-GlcN のグリコシド結合が HF 処理中に開裂することにより生じた artifact であった。

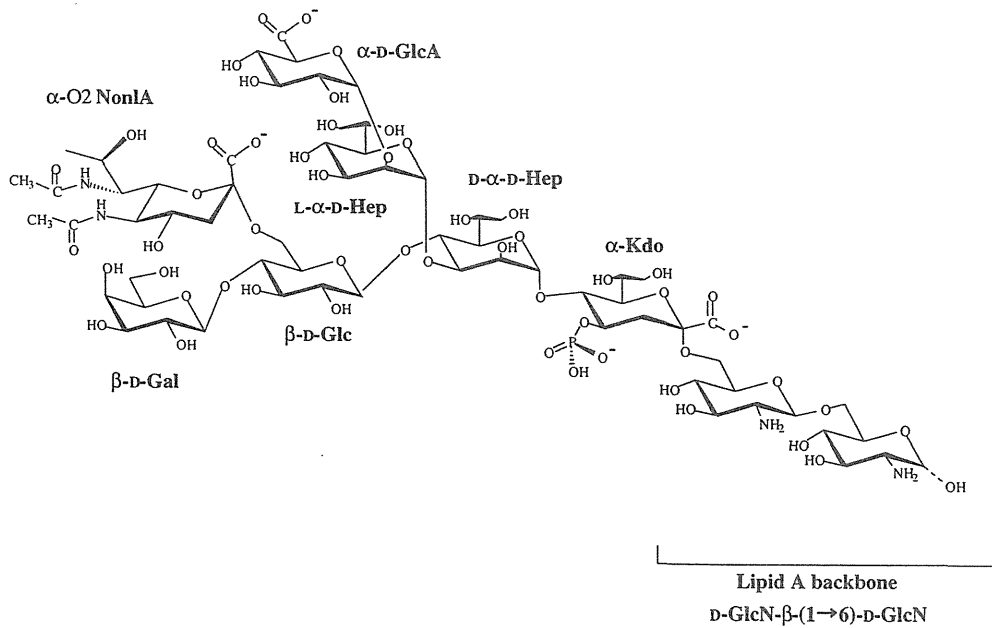


Fig. 3-8. Proposed structure of the carbohydrate backbone of *V. parahaemolyticus* O2 LPS.

3-4. メチル化分析

PS1 を構成する糖残基間の結合位置を確認するためメチル化分析を行った。その結果 (Table. 3-5)、以下の partially methylated alditol acetate が検出された。PS1 の還元末端部に存在する D-glucosaminitol 由来の 6-*O*-acetyl-2-methylacetamido-2-deoxy-1,3,4,5-tetra-*O*-methyl-glucitol; 非還元末端 D-Gal 由来の 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galactitol; 同じく非還元末端の D-GlcA 由来の 1,5-di-*O*-acetyl-6-carboxymethyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-glucitol; 6 位に置換基を持つ D-GlcN 由来の 1,5,6-tri-*O*-acetyl-2-methylacetamido-2-deoxy-3,4-di-*O*-methyl-glucitol; 4 位と 6 位に置換基を持つ D-Glc 由来の 1,4,5,6-tetra-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-glucitol; 2 位に置換基を持つ L,D-Hep 由来の 1,2,5-tri-*O*-acetyl-3,4,6,7-tetra-*O*-methyl-L-glycero-D-manno-heptitol; 3 位と 4 位に置換基を持つ D,D-Hep 由来の 1,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-2,6,7-tri-*O*-methyl-D-glycero-D-manno-heptitol などである。これらの誘導体の他に少量ではあるが、4 位に置換基を持つ D-Glc 由来

Table 3-5. Methylation analysis of the carbohydrate backbone (PS1) of LPS isolated from *V. parahemolyticus* O2

Partially methylated alditol acetate	Position of substitution	Molar ratio ^{a)}
1,5-Ac ₂ Gal-ol	—	0.54
1,5-Ac ₂ GlcA-ol	—	0.65
1,4,5-Ac ₃ Glc-ol	4	0.18
1,2,5-Ac ₃ L,D-Hep-ol	2	0.60
1,4,5,6-Ac ₄ Glc-ol	4, 6	1.37
1,3,4,5-Ac ₄ D,D-Hep-ol	3, 4	1.00
6-Ac ₂ GlcNAc-ol	6	0.73
1,5,6-Ac ₃ GlcNAc-ol	6	0.82

1,5-Ac₂Gal-ol; 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galactitol, 1,5-Ac₂GlcA-ol; 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-glucitol [6-2D], 1,4,5-Ac₃Glc-ol; 1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-glucitol, 1,2,5-Ac₃L,D-Hep-ol; 1,2,5-tri-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-heptitol, 1,4,5,6-Ac₄Glc-ol; 1,4,5,6-tetra-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-glucitol, 1,3,4,5-Ac₄D,D-Hep-ol; 1,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-methyl-heptitol, 6-Ac₂GlcNAc-ol; 6-*O*-acetyl-1,2,3,4,5-penta-*O*-methyl-glucosaminitol, 1,5,6-Ac₃GlcNAc-ol; 1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-glucosaminitol.

a) Molar ratios were calculated based on 1,3,4,5-Ac₄D,D-Hep-ol (=1.0).

の 1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-glucitol も検出された。前述の様に PS1 の NMR による構造解析では D-Glc は 4 位に D-Gal、6 位には O2 NonlA が置換したもののみが存在することが示されているが、6 位に置換している NonlA は化学的に不安定なケトシド結合によって結合している。従って、ここで検出された 4 位に置換基をもつ D-Glc 由来の誘導体は PS1 のメチル化の過程において、その 6 位の置換基である O2 NonlA が切断がされることによって生じたものであると考えられた。また Kdo および O2 NonlA は酸加水分解に対して非常に不安定な物質であるために、本メチル化分析では検出されなかった。以上、メチル化分析の結果は NMR の解析結果を強く支持するものであった。

考察

腸炎ビブリオでは、すべての血清型においてその LPS 多糖鎖は低分子量の糖鎖であることが SDS-PAGE および LPS 多糖部の糖分析により明らかにされている [23]。さらに O12 では LPS 多糖鎖の全構造が解明され、9 種類、10 個の単糖で構成される低分子糖鎖であることが示された [20]。本研究で明らかにされた腸炎ビブリオ O2 の LPS 多糖鎖も 9 個の単糖で構成される低分子糖鎖であった。O2 および O12 LPS の lipid A バックボーンはいずれも、多くのグラム陰性細菌の LPS におけるそれと同様に β -D-GlcN-(1 \rightarrow 6)-D-GlcN であった。その非還元末端 D-GlcN の 6 位には 1 分子の Kdo が結合しており、Kdo の 4 位にはリン酸が結合し、5 位は糖鎖の結合位置であった。この Kdo-lipid A 領域の構造は腸炎ビブリオだけではなく、*Vibrio* 科に属する多くの菌種の LPS にも共通した構造であることが示唆されている [17]。一方、Kdo に結合している糖鎖の構造は O2 と O12 の LPS では大きく異なっていた。O2 LPS は 1 分子ずつの L,D- および D,D-Hep を構成糖として含むが、Kdo の 5 位にはこのうち D,D-Hep が結合しているのに対して、O12 LPS では同位置に L,D-Hep が結合していた。さらに D,D-Hep は O2 以外の血清型 LPS からは検出されておらず、O2 LPS にもみ存在する構成糖であった。一般にグラム陰性菌の LPS では Kdo-Hep 領域は inner core 領域と称され、構造上最も変異が少ないとされる。しかしながら腸炎ビブリオではこの inner core に相当する領域においてさえも構造変異が存在し、O2 LPS は O12 および他の血清型 LPS と異なる構造を持つことが明らかとなった。グラム陰性菌の S 型 LPS では、O 抗原特異

多糖鎖の構造が各菌種の血清型によって大きく異なり、それらの構造の多様性が O 抗原の血清学的特異性に反映される。一方、core 領域の化学構造はそれぞれの菌種によって同一の構造であり血清学的特異性を示さない。これに対して腸炎ビブリオ LPS の化学構造は明らかに R-type であるにもかかわらず、血清学的特異性を示す。これは腸炎ビブリオ LPS では、通常のグラム陰性菌 LPS の core に相当する糖鎖部の構造の変異が各々の血清学的特異性に反映されるためである。

O2 LPS の構成糖として PS1 の構成糖以外に、弱酸処理または HF 処理によって容易に遊離する D-GalA が存在する。この D-GalA の結合位置は明らかにされなかったが、おそらくリン酸を介して LPS 多糖鎖または lipid A に結合していると考えられる。

第4章 腸炎ビブリオ OUT 菌株 KX-V212 LPS の構造解析

OUT 菌株として分離された KX-V212 は、既知血清型とは明らかに異なる新血清型であることが明らかにされた。また、本菌株は O2 LPS と血清学的交叉反応性を示す。そこで本章では KX-V212 の LPS 多糖鎖の構造解析を行い、O2 LPS のそれと比較検討した。

4.1. LPS および 化学修飾した LPS の化学分析

LPS および deacylated HF-LPSred の糖組成を Table 4-1 に示した。LPS では D-Glc、D-Gal、D-GlcN、D-GlcA、D-GalA、L,D-Hep、Kdo および OUT NonIA が構成糖として検出された。また、deacylated HF-LPSred では LPS で検出された脂肪酸およびリン酸はすべて除去されており、D-GalA を除いて LPS で検出されたすべての構成糖が検出された。しかし、LPS および deacylated HF-LPSred とともに L,D-Hep の含量は同じ化学型 III の LPS と比較して 1/10 程度であることから、KX-V212 LPS の L,D-Hep は他の血清型とは異なり、酸加水分解に対して抵抗性を示す置換基をもつことが示唆された。さらに KX-V212 LPS は同化学型に属する LPS よりもウロン酸含量が高いことも特徴の 1 つであった。

Table 4-1. Sugar composition of LPS and dephosphorylated, reduced and deacylated LPS (deacylated HF-LPSred) obtained from *V. parahaemolyticus* KX-V212

Component sugar	LPS	Deacylated HF-LPSred
D-Glucose	0.343	0.530
D-Galactose	0.221	0.304
L-glycero-D-manno-heptose	0.026	0.183
D-Glucosamine	0.199	0.240
Uronic acid ^{a)}	0.648	1.158
D-Glucuronic acid	+	+
D-Galacturonic acid	+	-
Kdo ^{b)}	+	+
OUT NonIA ^{c)}	+	+
Phosphate	1.002	-
C14:0	0.194	-
3-OH-C14:0	0.203	-
C16:0	0.063	-

a) Values were expressed as $\mu\text{mol} / \text{mg}$ of samples. Uronic acid was estimated by a colorimetric method and the presence of glucuronic and galacturonic acid were confirmed by GC and GC-MS after reduction of their carboxyl groups. b) Kdo was not detected by the periodate-thiobarbituric acid reaction, but its presence was confirmed by GC and GC-MS. c) 5-(*N*-acetyl)-amino-7-[*N*-(*N*-acetyl)-*D*-alanyl]-amino-3, 5, 7, 9-tetrahydroxy-*D*-glycero-*D*-galacto-non-2-ulosonic acid.

LPS の構造の概要を知るためにまず、脱 *O*-アシル化した LPS_{OH} を MALDI-TOF MS (negative ion mode) によって分析した (Fig. 4-1)。その結果、4 つの主要な ion peak (m/z 2619.0、2875.0、2699.0、2998.0) が検出された。このうち、最も大きなイオン m/z 2998.0 は 3 分子の HexA、2 分子ずつの Hex、Hep、HexN、1 分子ずつの Kdo と OUT NonIA で構成される糖鎖に 4 分子のリン酸、2 分子の 3-OH-C14:0 および 1 分子のエタノールアミンが結合した分子 (分子量: 2999.6 Da) の分子イオン [M-H]⁻ に相当していた。 m/z 2875.0、2699.0 および 2619.0 のイオンはこの分子が順次 リン酸-エタノールアミン、HexA およびリン酸を失った分子 (それぞれの分子量 2876.5、2700.4、2620.3) に相当するものであった。KX-212 LPS は O2 LPS と同様にエタノールアミンを構成成分として含むことが明らかとなった。

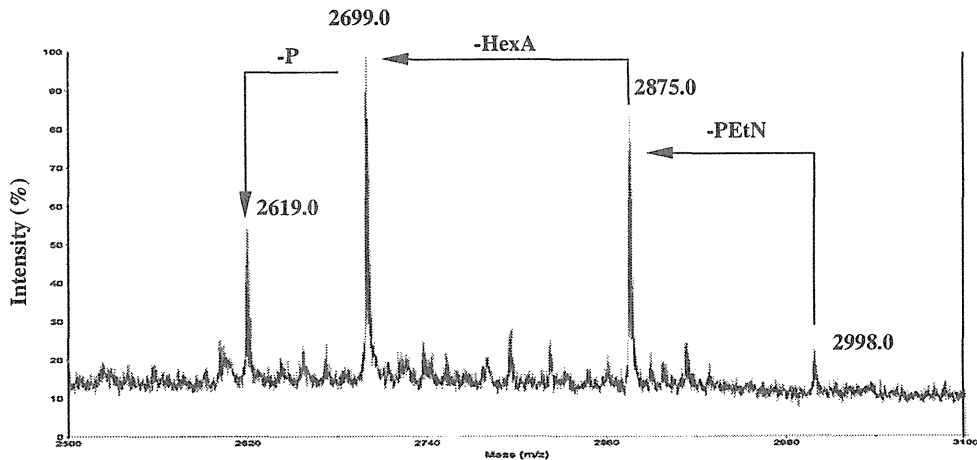


Fig. 4-1. MALDI-TOF Mass spectrum (negative ion mode) of de-*O*-acylated LPS (LPS_{OH}) from *V. parahaemolyticus* KX-V212. The ion at m/z 2699.0 corresponds to the calculated molecular weight (2700.4 Da) of nonasaccharide Hex₂/Hep₂/HexA₂/HexN₂/Kdo/OUT NonIA containing three moles of phosphate, two moles of 3-OH-C14:0 and one mole of HOEtN. HOEtN; ethanolamine, PEtN; phosphoryl ethanolamine.

4-2. KX-V212 LPS 多糖鎖の精製

Deacylated HF-LPSred (32.4 mg) を DEAE Sephacel chromatography (0~300 mM NaCl) (Fig. 4-2) によって精製した結果、150 mM (FrcI', 2.5 mg) および 170 mM (FrcII', 8 mg) 付近に溶出される 2 つの画分に分離された。FrcII' をさらに HPAEC によって精製して得られた主要画分 (PS1', 1 mg) を用いて NMR によって構造解析を行った。一方、FrcI' はその ¹H-NMR スペクトルから OUT NonIA に由来する proton のシグナルが完全に消失していたことから、LPS の化学処理中に OUT NonIA を損失して生じた artifact であると考えられ、これ以上の解析は行わなかった。

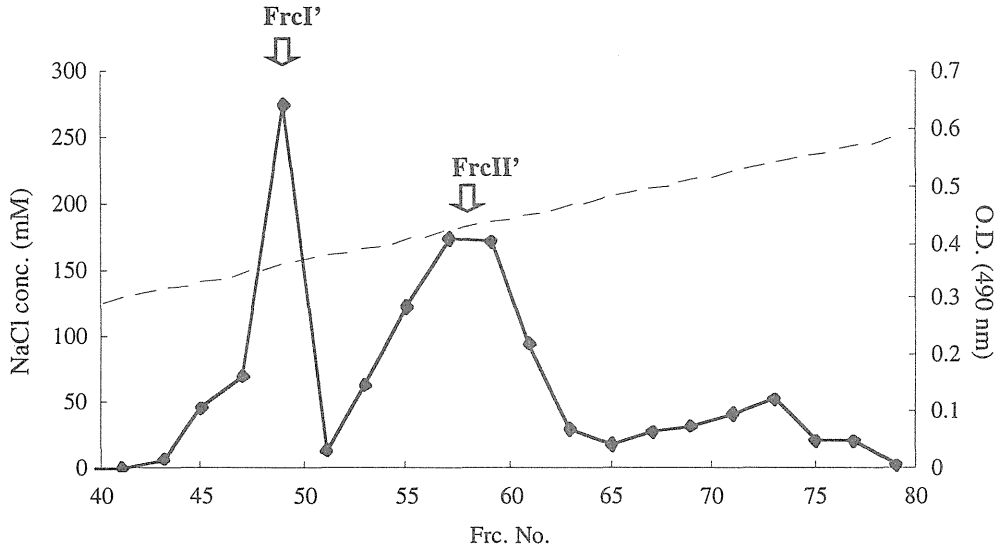


Fig. 4-2. Elution profile of DEAE Sephacel chromatography of deacylated HF-LPSred from *V. parahaemolyticus* KX-V212. The column was eluted with 0 to 300 mM NaCl linear gradient in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5).

4-3. NMR による PS1' の構造解析

^1H -、 ^{13}C -NMR のスペクトルは COSY、PTOCSY、FG-HMQC、FG-HMBC および NOESY スペクトルを用いて帰属した。Table. 4-2、4-3 に ^1H -NMR と ^{13}C -NMR のデータを示した。そのスペクトル (Fig. 4-3) からは 6 個の anomeric proton が 4.5–5.6 ppm の範囲に観察されたが、これらのシグナルはそれぞれの ring proton の vicinal coupling constant 値に基づき、低磁場側から L,D-Hep(I)、L,D-Hep(II)、D-GlcA(I)、D-Glc、D-Gal および D-GlcA(II) の H-1 に帰属された。各構成糖の ring proton は COSY と PTOCSY スペクトル (Fig. 4-4) に基づいて帰属し、ring carbon は FG-HMQC および PHSQC-TOCSY スペクトル (Fig. 4-5) に基づいて帰属した。また D-Gal、D-Glc および D-GlcA(II) の $J_{\text{H1,H2}}$ coupling constant 値 (7.8 Hz) から、これらの糖残基のアノマー配位は β -配位であり、D-GlcA(I) はその $J_{\text{H1,H2}}$ (3.7 Hz) から α -配位であることが明らかとなった。一方、L,D-Hep(I) および L,D-Hep(II) のアノマー配位は non-decoupling INEPT により測定した coupling constant 値 $J_{\text{C1,H1}}$ [L,D-Hep(I): 172.9 Hz, L,D-Hep(II): 170.0 Hz] から α -配位であることが明らかとなった。また Kdo および OUT Non1A のアノマー配位は、前章で述べたと同様に、いずれも α -配位であることが明らかになった。

Table 4-2. ¹H-NMR data of the carbohydrate backbone (PS1') prepared by dephosphorylation and deacylation from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS

Residue proton	Chemical shifts of the component sugars, ppm ($J_{n,n+1}$)								
	D-Gal	D-Glc	D-GlcA(I)	D-GlcA(II)	L,D-Hep(I)	L,D-Hep (II)	Kdo	OUT NonIA	D-glucosaminitol
H-1-a	4.550 (7.8)	4.582 (7.8)	5.122 (3.7)	4.489 (7.8)	5.547 (<1)	5.256 (<1)			3.843 (7.3; 12.3)
H-1-b									3.952 (4.1)
H2	3.512 (9.2)	3.461 (9.6)	3.680 (10.1)	3.532 (9.2)	4.314 (2.8)	4.261 (3.2)			3.610 (6.9)
H-3 (axial)	3.726 (3.2)	3.663 (10.5)	3.820 (9.2)	3.585 (9.2)	4.066 (10.1)	4.327 (10.5)	1.967 (12.3; 12.4)	1.865 (11.0; 12.8)	4.178 (2.8)
H-3 (equatorial)							2.205 (4.6)	2.873 (4.6)	
H-4	3.988 (<1)	3.591 (10.5)	3.521 (9.2)	3.709 (9.6)	3.936 (9.3)	4.236 (9.7)	4.245 (2.8)	3.749 (10.8)	3.754 (7.8)
H-5	3.795	3.771	4.158	3.758	3.806 (3.2)	4.167 (2.7)	4.191 (2.8)	3.230	4.018
H-6-a	3.582 (7.8; 11.5)	4.028 (6.8; 12.4)			4.212	4.120	3.728 (9.2)	4.408	3.805 (6.4; 11.5)
H-6b	3.610 (4.7)	4.066 (2.3)							3.865 (2.8)
H-7-a					3.772 (7.8; 11.5)	3.658 (5.5; 10.5)	3.940	3.515 (9.2)	
H-7b					3.870 (4.6)	3.820 (6.9)			
H-8-a							3.617 (6.4; 11.9)	4.241 (6.4)	
H-8b							3.951 (3.7)		
H-9								1.454	

Acetone was used as an internal reference (δ_{H} 2.225 ppm).

Table 4-3. ¹³C-NMR data of the carbohydrate backbone (PS1') prepared by dephosphorylation and deacylation from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS

Residue carbon	Chemical shifts of the component sugars, ppm ($J_{C,H1}$)								
	D-Gal	D-Glc	D-GlcA(I)	D-GlcA(II)	L,D-Hep(I)	L,D-Hep (II)	Kdo	OUT NonIA	D-glucosaminitol
C-1	102.23 (163.2)	102.27 (161.9)	100.40 (172.0)	101.69 (161.3)	100.21 (172.9)	99.54 (170.0)	171.26	172.90	58.54
C-2	70.72	72.35	71.51	71.89	79.55	77.27	101.51	98.03	55.08
C-3	72.24	73.96	72.07	75.28	70.42	72.56	34.38	39.91	65.69
C-4	68.21	77.92	71.87	71.32	66.50	73.18	65.46	68.95	71.52
C-5	74.90	73.96	73.45	77.11	71.00	70.80	72.91	52.54	70.34
C-6	64.24	64.08	177.08	177.20	67.45	68.21	71.29	72.58	60.70
C-7					62.77	62.84	68.69	54.42	
C-8							62.69	65.59	
C-9								18.21	

Acetone was used as an internal reference (δ_C 31.45 ppm).

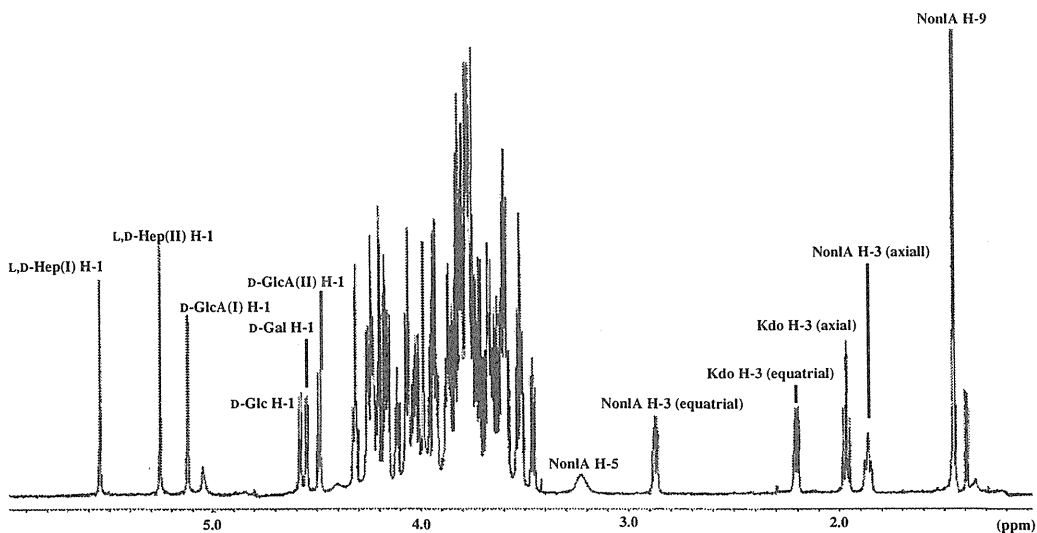


Fig. 4-3. $^1\text{H-NMR}$ (JEOL, ECA 800) spectrum of PS1' from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

$^{13}\text{C-NMR}$ において観測された 2 本のカルボキシルシグナル (171.26 ppm, 172.90 ppm) は HMBC スペクトルにおける correlation からそれぞれ Kdo および OUT NonIA の C-1 に帰属された。同様に 2 本のカルボキシルシグナル (177.08 ppm, 177.20 ppm) はそれぞれ D-GlcA(I) と D-GlcA(II) の C-6 に帰属された。

Table 4-4. Important NOE effects observed in two dimensional NOESY of the carbohydrate backbone (PS1') prepared by dephosphorylation and deacylation from *V. parahaemolyticus* O2 LPS

Residue	Residue proton	Interresidual NOE	
		Sugar residue	Position (Intensity)
β -D-Glc	H-1	L- α -D-Hep(II)	4 (S)
β -D-Gal	H-1	β -D-Glc	4 (S)
β -D-GlcA	H-1	L- α -D-Hep(II)	2 (S)
α -D-GlcA	H-1	L- α -D-Hep(I)	1 (w), 2 (s)
L- α -D-Hep(I)	H-1	L- α -D-Hep(II)	3 (s)
		α -D-GlcA	1 (w)
L- α -D-Hep(II)	H-1	α -Kdo	5 (s), 7 (m)
α -Kdo	H-3 (ax, eq.)	D-Glucosaminitol	6-a (w), 6-b (w)
α -OUT NonIA	H-3 (ax, eq.)	L- α -D-Hep(I)	3 (m)

The intensity of NOE effects were expressed as strong (s), medium (m), weak (w).

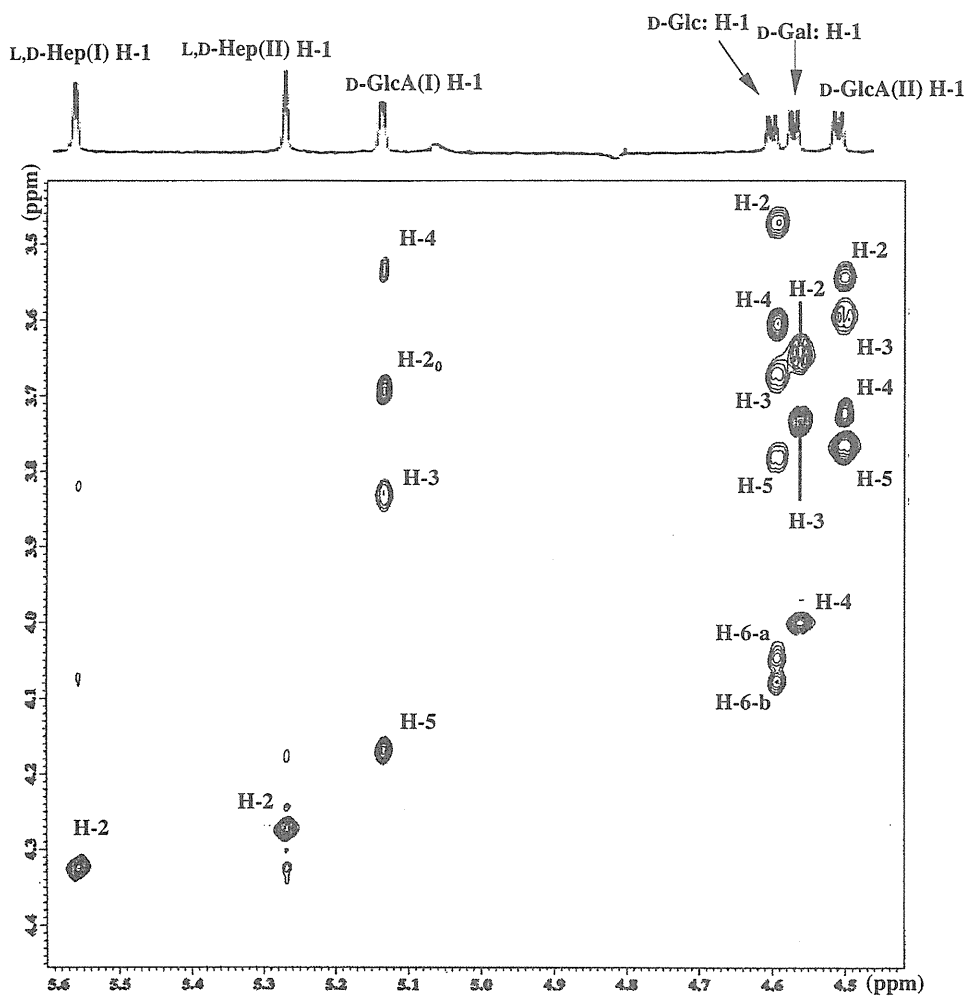


Fig. 4-4. PTOCSY spectrum (anomeric region) of PS1' from *V. parahaemolyticus* KX-V212.

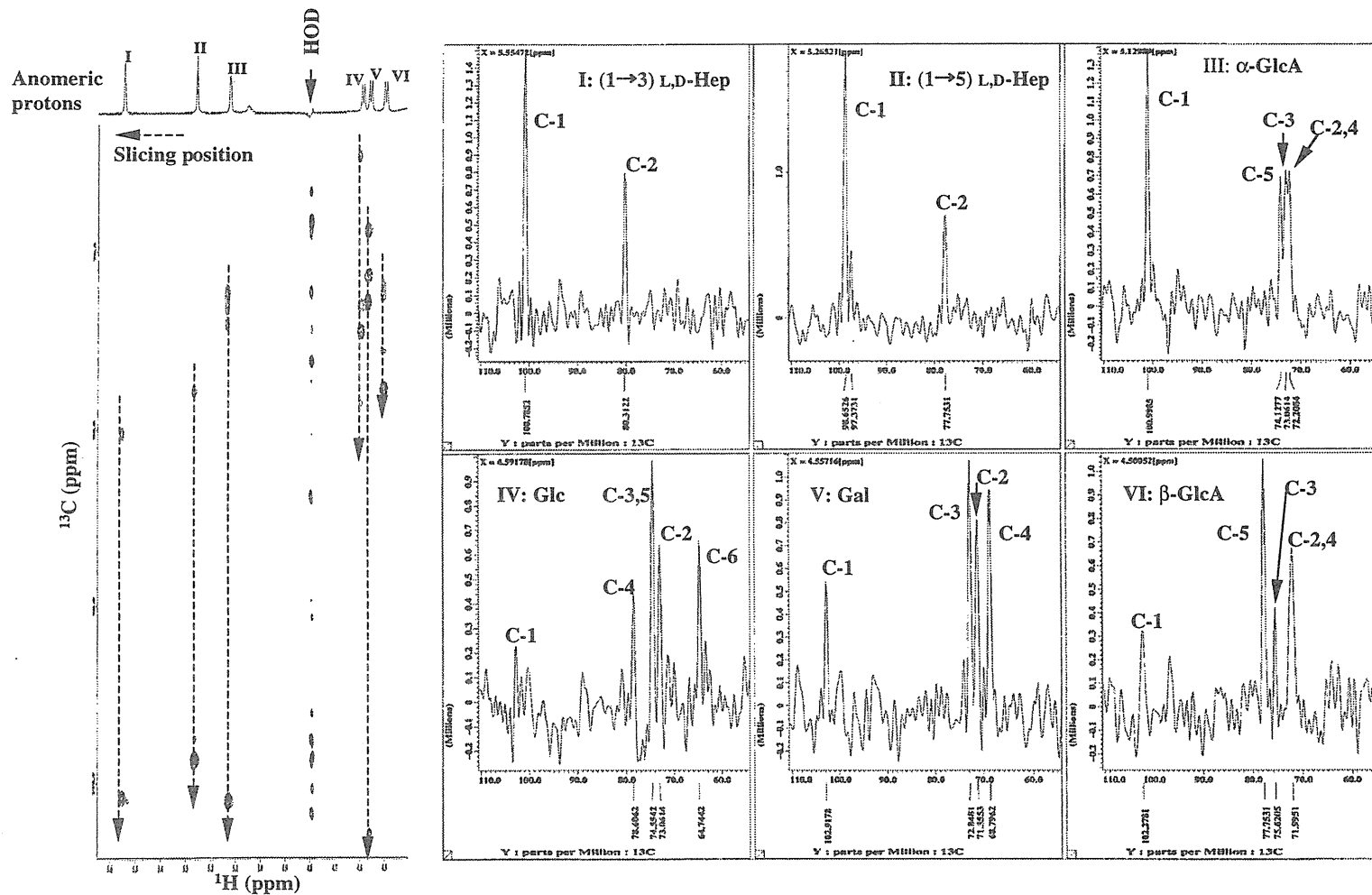


Fig. 4-5. The assignment of carbon signals in HSQC-TOCSY spectrum of PS1' of *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

Table 4-4 に糖残基間の結合位置を証明する NOE 効果をまとめて示した。Kdo の H-3 (axial, equatorial) と D-glucosaminitol の H-6-a、-b との間に NOE 効果が認められたことから、PS1' の還元末端構造は α -Kdo-(1 \rightarrow 6)-D-glucosaminitol であることが明らかとなった。また OUT NonIA の H-3 (axial, equatorial) は L,D-Hep(I) H-3、GlcA(I) の H-1 は L,D-Hep(I) H-2、L,D-Hep(I) の H-1 は L,D-Hep(II) H-3 に対して強い correlation を示した。これらの NOE 効果から PS1' は部分構造として α -D-GlcA-(1 \rightarrow 2)-[α -NonIA-(1 \rightarrow 3)]-L- α -D-Hep(I)-(1 \rightarrow 3)-L- α -D-Hep(II) を持つことが明らかとなった。さらに D-Gal の H-1 と D-Glc H-4 の間、D-Glc の H-1 と L,D-Hep(II) H-4 の間にも同様に NOE 効果が認められたことから、部分構造として β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-L- α -D-Hep(II) が存在することが明らかとなった。また D-GlcA(II) の H-1 は L,D-Hep(II) H-2 に対して強い NOE 効果を示すとともに、HMBC スペクトルにおいて D-GlcA(II) の H-1 と L,D-Hep(II) の C-2 との間にも correlation が確認された。すなわち、D-GlcA(II) は L,D-Hep(II) の 2 位に結合していることが示された。以上の結果から、PS1' は Fig. 4-6 に示した構造であることが明らかとなった。

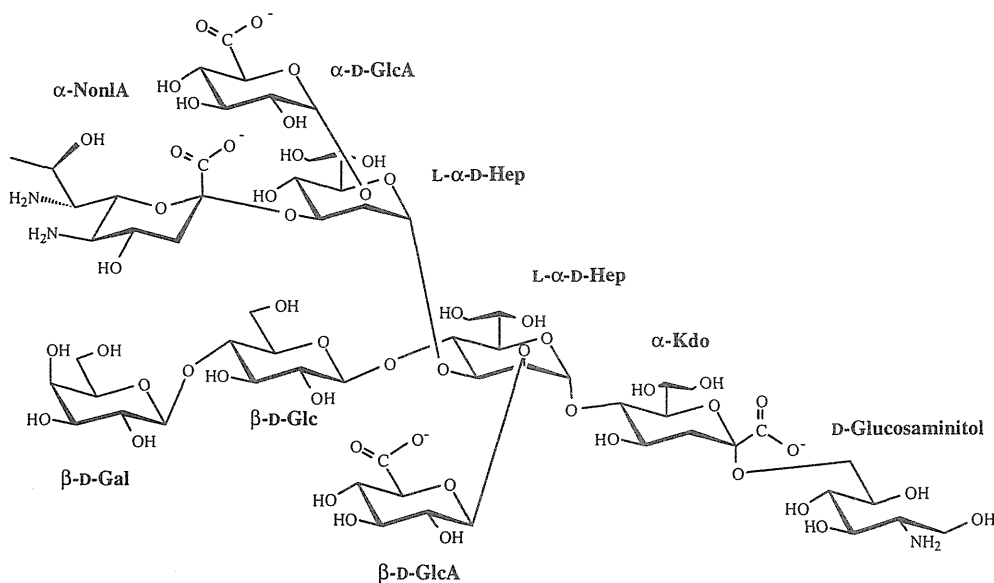


Fig. 4-6. Structure of PS1' isolated from LPS of *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

4-4. NMR による KX-V212 LPS の lipid A backbone の構造解析

前述の PS1' の構造において、その非還元末端部、すなわち lipid A backbone に相当する部位には D-glucosaminitol が 1 分子のみ存在した。このことは、KX-V212 LPS の lipid A が D-GlcN 1 分子のみで構成されることを示唆するものである。しかし、LPS_{OH} の MALDI-TOF MS の結果からも明らかなように LPS 分子中には D-GlcN は 2 分子存在するため、これは PS1' 調整時に生じた artifact とも考えられる。そこで次に KX-V212 LPS の完全な lipid A backbone の構造解析を行った。

Deacylated lipid A backbone の ¹H- および ¹³C-NMR スペクトルは PDQF-COSY、FG-HMQC、HMBC および PHOHAHA によって帰属した (Table. 4-5)。その ¹H-NMR スペクトル (Fig. 4-7) からは 2 つの anomeric proton シグナル (4.850, 5.583 ppm) が観察され、それぞれの ring proton の vicinal coupling constant から、いずれも *gluco*-configuration の 6 炭糖であることが明らかとなった。さらに FG-HMQC (Fig. 4-8) スペクトル解析の結果、両構成糖ともに C-2 のシグナルが 50 ppm 付近に観察されたことから C-2 位にはアミノ基が結合しており、これらは D-GlcN であることが示された。また、 J_{H_1,H_2} coupling constant 値から非還元末端の D-GlcN は β - 配位

Table 4-5. ¹H- and ¹³C-NMR data of deacylated lipid A backbone of *V.parahaemolyticus* KX-V212 LPS

Residue proton	Chemical shift of ($J_{n,n+1}$)				
	Non-reducing terminus (a) GlcN	Reducing terminus (b) GlcN	Residue carbon	Non-reducing terminus (a) GlcN	Reducing terminus (b) GlcN
H-1	4.850 (8.5)	5.583 (3.7, 7.3 ^a)	C-1	101.72	92.62
H-2	2.950 (10.1)	3.179 (9.8)	C-2	57.20	55.95
H-3	3.775 (9.8)	3.860 (9.8)	C-3	74.26	71.96
H-4	3.899 (9.8)	3.465 (10.1)	C-4	73.38	71.19
H-5	3.548	4.165	C-5	76.95	73.33
H-6-a	3.84-3.89	3.914 (7.0; 12.2)	C-6	61.70	69.86
H-6-b	(4.3, 2.8)	4.247 (1.8)			

a: J_{HP} Acetone was used as an internal reference (δ_H 2.225 ppm, δ_C 31.45 ppm).

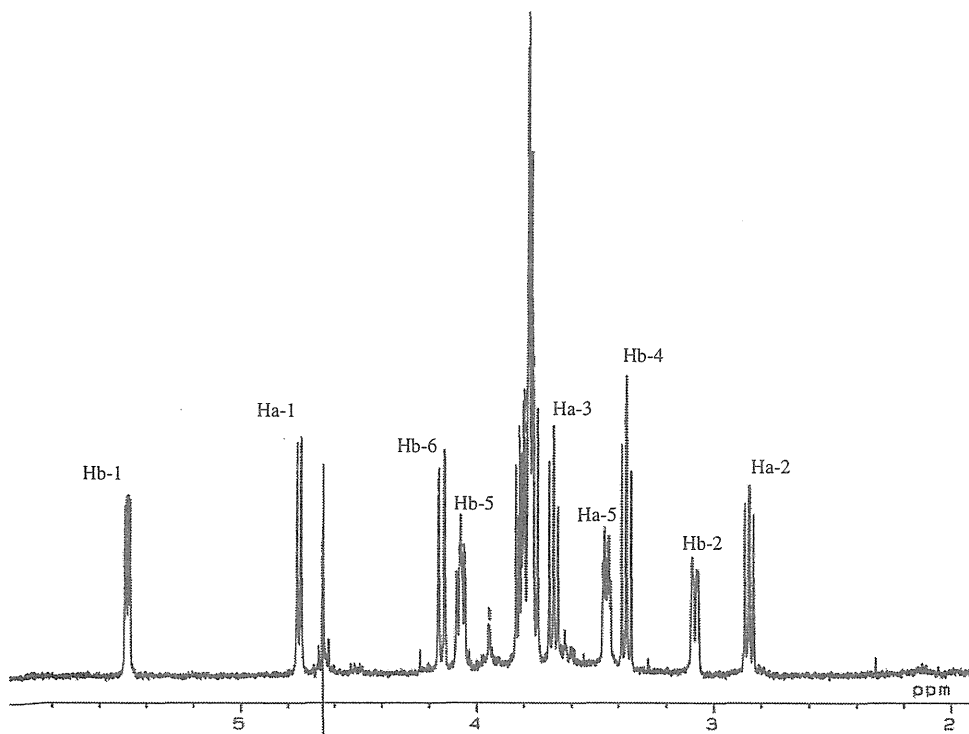


Fig. 4-7. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of de-acylated lipid A backbone from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.
 a: GlcN at non-reducing terminus, b: GlcN at reducing terminus.

(8.54 Hz)、還元末端の D-GlcN は α - 配位 (3.67 Hz) であると同一した。HMBC スペクトルでは、還元末端の D-GlcN の C-6 と非還元末端の D-GlcN の H-1 との間、および D-GlcN の H-6-a、-b と非還元末端の D-GlcN の C-1 との間に correlation が観察され、さらに還元末端の D-GlcN の C-6 のシグナルは非還元末端の D-GlcN の C-6 のそれと比較して 8 ppm 低磁場シフトしていた。これは還元末端 D-GlcN の 6 位に置換基が結合していることを示しており、HMBC の結果を強く支持した。従って、本 LPS の lipid A backbone 構造は β -D-GlcN-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcN であることが明らかにされ、KX-V212 LPS の lipid A backbone は O2 LPS におけるそれと同様の構造をもつことが示された。一方、還元末端 D-GlcN の H-1 シグナルからは coupling constant 値として $J_{\text{H1,H2}}$ (3.67 Hz) 以外に、7.33 Hz の proton coupling が観察された。さらに非還元末端 D-GlcN の H-4 および H-5 のシグナルは標準の D-GlcN のそれらの chemical shift 値と比較して高磁場にシフトしていた。すなわち、還元末端 D-GlcN の H-1 位と非還元末端 D-GlcN の H-4 位とともに置換基が結合していることを示していた。そこで還元末端 D-GlcN の C-1 位に結合している置換基を検討するために $^3\text{P,}^1\text{H-HMQC}$ による測定を行った (Fig. 4-9)。その結果、2 本のリンの

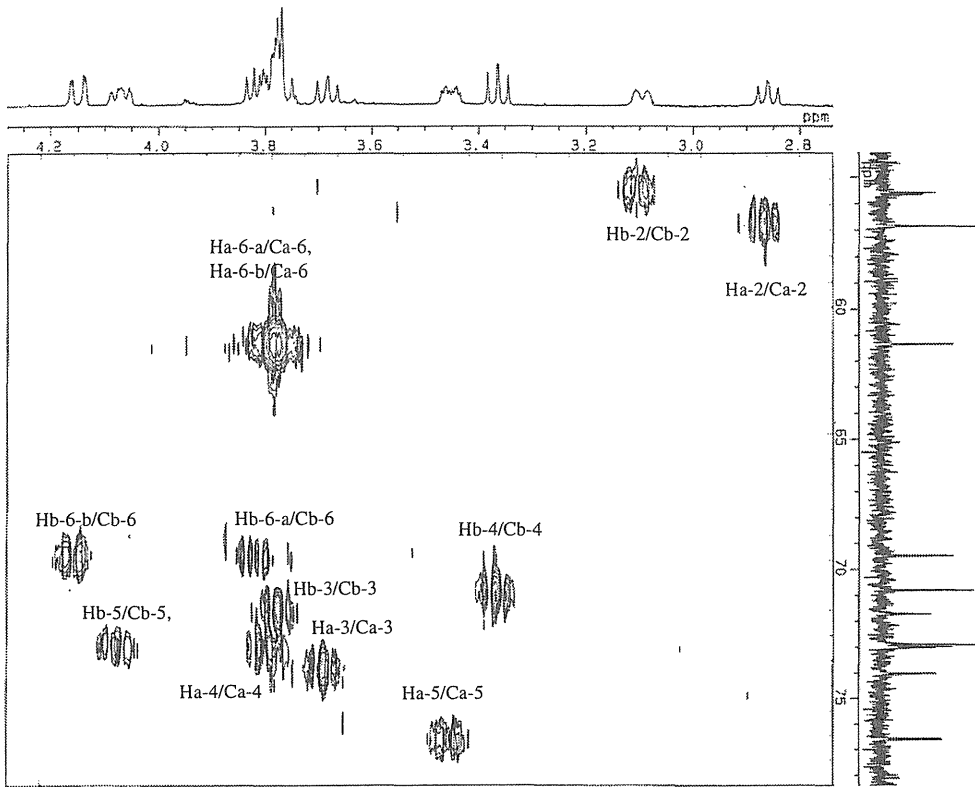


Fig. 4-8. FG-HMQC spectrum of deacylated lipid A backbone from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS. a: GlcN at non-reducing terminus, b: GlcN at reducing terminus.

シグナルが検出され、2.42 ppm のリンのシグナルは還元末端 D-GlcN H-1 との間に、0.03 ppm のリンのシグナルは非還元末端 D-GlcN の H-4 との間に強い correlation が認められたことから、還元末端 D-GlcN C-1 と非還元末端 D-GlcN C-4 にはともにリン酸基が結合していることが明らかとなった (Fig. 4-10)。

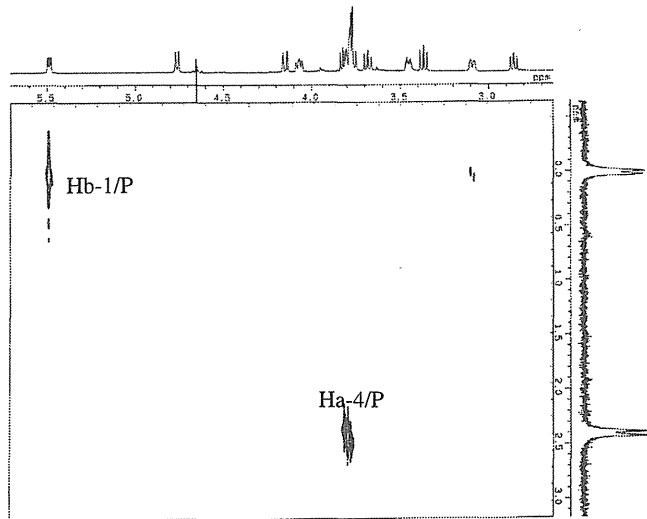


Fig. 4-9. ^{31}P , ^1H -HMQC spectrum of deacylated lipid A backbone from *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS. a: GlcN at non-reducing terminus, b: GlcN at reducing terminus.

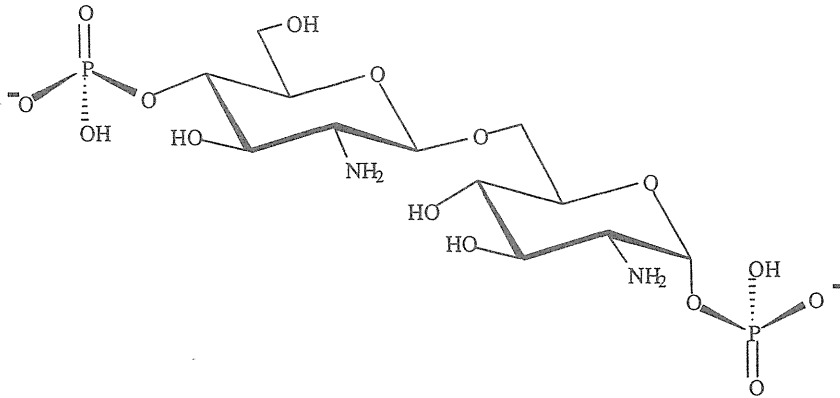


Fig. 4-10. Structure of the deacylated lipid A backbone isolated from KX-V212 LPS.

以上の結果と、PS1' について得られた結果から、KX-V212 の LPS 多糖鎖の構造は Fig. 4-11 に示したように 7 種 10 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。KX-V212 の LPS にも、O2 LPS と同様に D-GalA が存在するが、この D-GalA は LPS 多糖鎖の調製過程で遊離するため、その結合位置は不明であるが、O2 LPS と同様にリン酸を介して結合していると考えられる。

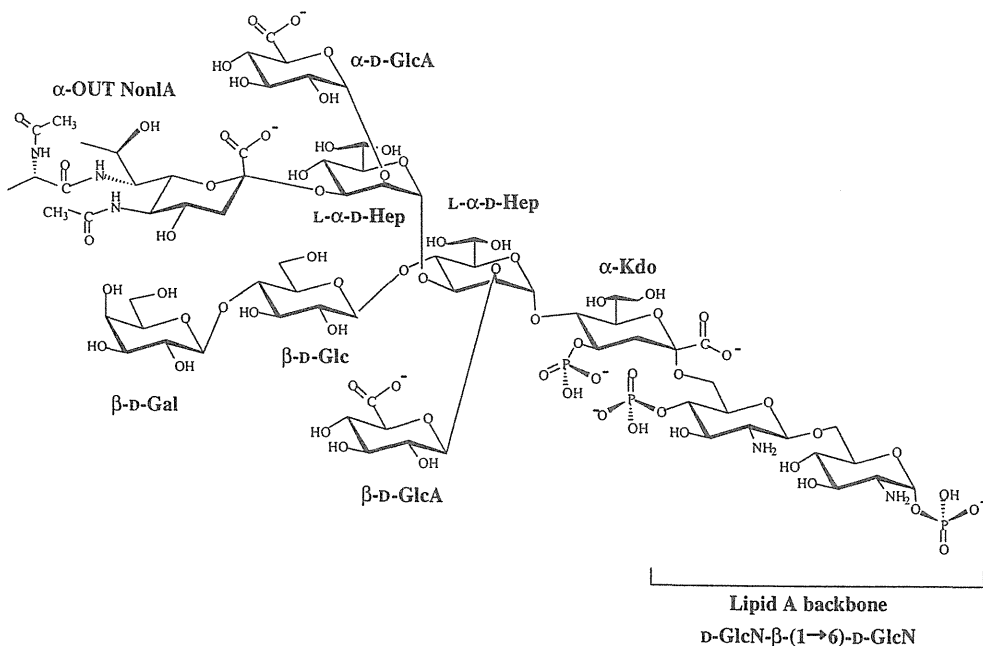


Fig. 4-11. Proposed structure of the carbohydrate backbone of *V. parahaemolyticus* KX-V212 LPS.

4-4. メチル化分析

KX-V212 の LPS 多糖鎖を構成する構成糖の結合位置をメチル化分析によって確認した。メチル化分析には LPS から lipid A を除去した多糖鎖部 (OS) を用いた。その結果、Table. 4-6 に示したように非還元末端の D-GlcA 由来の 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galactiol、4 位に置換基を持つ D-Glc 由来の 1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-gulcitol、2 位に置換基を持つ L,D-Hep 由来の 1,2,5-tri-*O*-acetyl-3,4,6,7-tetra-*O*-methyl-L-glycero-D-manno-heptitol、2~4 位に置換基を持つ L,D-Hep 由来の 1,2,3,4,5-penta-*O*-acetyl-6,7-di-*O*-methyl-L-glycero-D-manno-heptitol の 4 種類の部分メチル化糖が高感度に検出された。次に KX-V212 菌株 LPS 多糖鎖中に存在する D-GlcA の結合位置を確認するために carboxyl 基を NaBD₄ で還元した OS を用いて同様にメチル化分析を行った。その結果、前述の 4 種類の部分メチル化誘導体に加えて新たに 1,5-di-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-glucitol [6-2D] が検出された。その EI-MS からは C1~C2 と C1~C3 に由来するフラグメントイオン m/z 117 と 161 が検出されたが、C4~C6、C3~C6 に由来するフラグメントは、それぞれ m/z 163 と 207 であり、通常の Glc の同誘導体より得られるそれぞれのフラグメントイオンよりも分子量が 2 だけ大きくなっていた。このことは、OS の carboxyl 基の還元によってウロン酸の 6 位が還元され、2 個の重水素が導入されたことを示すものであった。また、その CI-MS では、分子イオン $[M+H]^+$ m/z 325 が検出され、この誘導体の計算分子量 324 Da と一致した。従って、KX-V212 菌株 LPS 中に存在する D-GlcA はともに非還元末端糖として存在することが明らかとなった。これらのメチル化分析の結果は NMR により得られたの結果を強く支持するものであった。

Table. 4-6. Partially methylated alditol acetates detected by methylation analysis of KX-V212 OS

Partially methylated alditol acetate	Position of substitution	Molar ratio ^{a)}
1,5-di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-galactiol	—	1.4
1,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-glucitol	4	1.2
1,2,5-tri- <i>O</i> -acetyl-3,4,6,7-tetra- <i>O</i> -methyl-L-glycero-D-manno-heptitol	2	1.0
1,2,3,4,5-penta- <i>O</i> -acetyl-6,7-di- <i>O</i> -methyl-L-glycero-D-manno-heptitol	2,3,4	1.0
1,5-di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-glucitol [6-2D]	—	1.9

a) Molar ratios were calculated based on 1,2,3,4,5-penta-*O*-acetyl-6,7-di-*O*-methyl-L-glycero-D-manno-heptitol (=1.0).

考察

本章で明らかにされた新血清型株 KX-V212 の LPS 多糖鎖も O2 および O12 の LPS 多糖鎖と同様に低分子糖鎖であった。前章で明らかにされた O2 の LPS 多糖鎖とその構造を比較すると、両多糖鎖ともに非還元末端部には D-GlcA、 β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-(1 \rightarrow 構造および *N*-置換基は異なるものの NonIA が存在する点で類似していた。このような構造類似性が両 LPS の血清学的交叉反応原性に関与するものと考えられる。しかし、NonIA の結合位置や、KX-V212 の LPS 多糖鎖には Kdo に隣接する L,D-Hep の 2 位に結合した D-GlcA が存在すること、さらに O2 の LPS 多糖鎖の Kdo に結合する Hep は D,D-Hep であったが、KX-V212 の LPS 多糖鎖の場合は O12 LPS の場合と同様に L,D-Hep であることなど相違点が認められた。KX-V212 の LPS には本菌株以外の LPS には見出されていない OUT NonIA が非還元末端として存在していた。この OUT NonIA またはそれを含む部分構造が、本菌株の血清学的特異性の発現に関与することが強く示唆された。

第5章 O2 LPS の血清学的特異性を示すエピトープの解析

前章までに述べたように腸炎ビブリオ O2 と KX-V212 の LPS 多糖鎖の構造が解明された。新血清型であることが明らかにされた KX-V212 の LPS は O2 LPS と血清学的交叉反応原性を示し、両 LPS には Non1A が存在することも明らかとなった。Non1A はこれら両株の LPS 以外の血清型株 LPS には見出されていないことから、両 LPS の血清学的特異性に深く関与していることが示された。そこで本章では O2 LPS の血清学的特異性を示すエピトープの解明を目的として LPS を固定化抗原として用いる ELISA および ELISA 阻止試験を行った。

5-1. ELISA および ELISA 阻止試験

O2 および KX-V212 の全菌抗血清を用いた ELISA 試験 (Table 5-1) では、前述の PH 試験の結果と同様に、O2 LPS と KX-V212 LPS との間で強い血清学的交叉反応原性が認められた。各血清の抗体価は 405 nm における吸光度が

Table 5-1. Reactivity of anti-*V.parahaemolyticus* O2 and anti-KX-V212 antisera in ELISA system

Antigen coated (LPS)	Reactivity with antiserum against	
	O2	KX-V212
O2	1930	270
KX-V212	1403	182

Titers of antisera were expressed as reciprocals of serum dilution which gave O.D. 0.2 at 405 nm.

0.2 を示す血清の希釈倍率として表した。抗 O2 抗血清の KX-V212 LPS に対する抗体価 (1430) は O2 LPS に対する抗体価 (1930) とほぼ同程度であり、また抗 KX-V212 抗血清の O2 LPS に対する抗体価 (182) も KX-V212 LPS に対する抗体価 (270) とほぼ一致する値であった。次いでこれらの抗血清を用い ELISA 阻止試験を行った。Table 5-2 に inhibitor として用いた LPS および化学処理 LPS の糖組成を示した。HF 処理した O2 および KX-V212 の LPS では、ともにリン酸と D-GalA が除去されていたが、それぞれの Non1A は含まれ、その他の構成糖の組成も LPS に類似していた。一方、LPS の弱酸処理によって lipid A を除去して得られた LPS 多糖部 (OS) では D-GalA とともに Non1A も失われていた。その他、両 LPS から単離した O2 Non1A と OUT Non1A、両 LPS 多糖鎖に共通して存在する非還元末端部の構造に相当する lactose [β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc] と GlcA も inhibitor として用いた。Table 5-3 にこれらの inhibitor を用いて行った ELISA 阻止試験の結果を示した。O2 LPS / 抗 O2 抗血清および KX-V212 LPS / 抗 KX-V212 抗血清の系に対して、

それぞれの系に homologous な LPS および HF-LPS は強い阻害活性を示した。これに対して、NonIA を含まない OS はそれらの系に対して阻害活性を全く示さなかった。また単離した O2 NonIA は O2 LPS / 抗 O2 抗血清系に対して弱いながらも明瞭な阻害活性を示した。NonIA に関してはさらに脱 *N*-アシル化後 *N*-アセチル化した KX-V212 LPS から分離した標品（すなわち O2 NonIA と同一物質）についても同様に検討した結果、O2 LPS 由来のものと同等の阻害活性をもつことが確認されたが、KX-V212 LPS から単離した OUT NonIA では全く阻害活性は認められなかった。一方、KX-V212 LPS / 抗 KX-V212 抗血清の系に対しては O2、KX-V212 いずれの LPS から分離した NonIA も阻害活性を示さなかった。また lactose と D-GalA にも両 ELISA 系に対する阻害活性は認められなかった。以上の結果から O2 LPS 多糖鎖に非還元末端糖として存在する NonIA は、O2 LPS の血清学的特異性を示す主要なエピトープの 1 つであることが強く示唆された。一方 KX-V212 LPS においては、OUT NonIA は血清学的特異性に関与している可能性は否定されないが、それ単独では LPS の主要エピトープとはなっていないものと推察された。

Table 5-2. Sugar composition of LPS, HF-LPS and OS isolated from *V. parahaemolyticus* O2 and KX-V212

Component sugar	O2			KX-V212		
	LPS	HF-LPS	OS	LPS	HF-LPS	OS
D-Glucose	0.214	0.328	0.807	0.343	0.336	0.497
D-Galactose	0.144	0.168	0.604	0.221	0.240	0.643
<i>L-Glycero-D-manno</i> -heptose	0.018	0.033	0.065	0.026	0.048	0.054
<i>D-Glycero-D-manno</i> -heptose	0.013	0.100	0.284	–	–	–
D-Glucosamine	0.088	0.380	–	0.199	0.231	–
Uronic acid ^{a)}	0.359	0.340	1.251	0.648	0.524	1.387
D-Glucuronic acid	+	+	+	+	+	+
D-Galacturonic acid	+	–	–	+	–	–
Kdo ^{b)}	+	+	+	+	+	+
O2 NonIA ^{c)}	+	+	–	–	–	–
OUT NonIA ^{d)}	–	–	–	+	+	–
Phosphate	1.329	0.036	0.134	1.002	0.073	0.116

a) Uronic acid was estimated by a colorimetric method as total amount of glucuronic and galacturonic acids, and the presence of glucuronic and galacturonic acids were confirmed by GC and GC-MS after reduction of their carboxyl groups. b) The exact content of Kdo was not obtained by the periodate-thiobarbituric acid reaction, but its presence was confirmed by GC and GC-MS. c) 5, 7-di-(*N, N'*-di-acetyl)-amino-3, 5, 7, 9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid. d) 5-(*N*-acetyl)-amino-7-[*N*-(*N*-acetyl)-D-alanyl]-amino-3, 5, 7, 9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid. Values were expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of samples.

Table 5-3. Inhibition of ELISA using antisera raised against *V. parahemolyticus* O2 and KX-V212

Inhibitor	Inhibitory dose ($\mu\text{g/mL}$) against ELISA system	
	O2 LPS / anti-O2 antiserum	KX-V212 LPS / anti-KX-V212 antiserum
<i>V. parahemolyticus</i> O2		
LPS	3.2	—
HF-LPS	0.56	—
OS	— ^{d)}	—
O2 NonIA ^{a)}	200	—
<i>V. parahemolyticus</i> KX-V212		
LPS	—	7.9
HF-LPS	—	20
OS	—	—
OUT NonIA ^{b)}	—	—
De- <i>N</i> -acylated, <i>N</i> -acetylated- OUT NonIA ^{c)}	210	—
β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc	—	—
D-GlcA	—	—

a) 5, 7-di-(*N*, *N'*-di-acetyl)-amino-3, 5, 7, 9-tetradecoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid isolated from O2 LPS. b) 5-(*N*-acetyl)-amino-7-[*N*-(*N*-acetyl)-D-alanyl]-amino-3, 5, 7, 9-tetradecoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid isolated from KX-V212 LPS. c) 5, 7-di-(*N*, *N'*-di-acetyl)-amino-3, 5, 7, 9-tetradecoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (O2 NonIA) isolated from *N*-deacylated and *N*-acetylated KX-V212 LPS. d) more than 1000 $\mu\text{g/mL}$.

考察

本章では ELISA 阻止試験によって、LPS の血清学的特異性を発現するエピトープと NonIA の関連性について検討した。O2 LPS / 抗 O2 抗血清の系に対して O2 NonIA を含む糖鎖および単離した O2 NonIA には阻害活性が認められ、O2 特異抗原因子としての O2 NonIA の関与が強く示唆された。一方、KX-V212 LPS より分離された OUT NonIA は O2 LPS / 抗 O2 抗血清の系を阻害せず、その N-7 の alanyl 基をアセチル基に変換することにより阻害活性を現した。このことは、NonIA の置換基も O2 特異抗原の抗原決定基として重要な役割を担っていることを示すものであった。KX-V212 の LPS および HF-LPS は KX-V212 LPS / 抗 KX-V212 抗血清に対して強い阻害活性を示した。しかしながら OUT NonIA それ単独では同系を阻害しないことから、おそらく OUT NonIA は KX-V212 LPS の血清学的特異性に関与する minor antigen factor として、あるいはエピトープの一部を構成する因子として存在すると考えられる。腸炎ビブリオ 13 種類の血清型の中で、O2 NonIA は O2 LPS にのみ存在する構成成分である。それ故に、O2 NonIA に対する monoclonal 抗体を作成できれば、O2 と他の血清型との間の複雑な類族反応を生ずることなく、血清診断を迅速且つ正確に行なうために非常に有用であると考えられる。

総括

腸炎ビブリオは食中毒の原因菌として、毎年多数の菌株が分離されるが、それらの中には従来の菌体凝集反応では血清型別が困難な、いわゆる OUT 菌株がしばしば見出される。第 1 章では、このような OUT 菌株について、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類とともに、LPS を用いる血清反応による血清型別を試みた。この血清反応によって OUT 菌株として分離された菌株の中には既知血清型に型別される菌株が含まれ、LPS 多糖部の糖組成もそれが属する血清型 LPS 多糖部のそれと一致することが示された。一方で、OUT 菌株の中には、既知血清型とは明らかに異なる血清学的特異性をもつ新血清型株が存在することも明らかにされた。OUT 菌株の存在は、臨床診断のみならず、疫学、食品衛生及び公衆衛生上大きな支障を来す。従って、OUT 菌株として分離される菌株については、今後、同様の手法により確実な血清型別を行うとともに、本研究で明らかにされた新血清型の存在も考慮に入れた血清型別が必要であると考えられる。

本研究で見出された新血清型株 KX-V212 の LPS は、O2 LPS と血清学的交叉反応原性を示し、両 LPS に共通する構成糖として Non1A が検出された。第 2 章では、これらの Non1A の構造解析を行い、O2 及び KX-V212 の LPS に含まれる Non1A はそれぞれ 5,7-di-(*N,N'*-di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galactonon-2-ulosonic acid と 5-(*N*-acetyl)-amino-7-[*N*-(*N*-acetyl)-D-alanyl]-amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galactonon-2-ulosonic acid であると同定した。Non1A のいくつかの異性体は、グラム陰性菌 LPS の構成糖として存在することが知られているが、アミノ酸 (D-Ala) を *N*-置換基にもったものの存在は本研究で初めて明らかにされた。

腸炎ビブリオは通常のグラム陰性菌と異なり、O 抗原特異多糖鎖をもたない低分子の糖鎖で構成される LPS を産生し、その低分子糖鎖の構造の違いが血清学的特異性に反映される。すなわち、腸炎ビブリオの 13 種の血清型 LPS には O 抗原特異性を決定するエピトープとして、各血清型に特有の構造が存在すると推察される。第 3 章と第 4 章においては、共通抗原性を示す O2 と KX-V212 の LPS 多糖部の構造解析を行った。腸炎ビブリオではこれまでにわずかに O12 のみの LPS 多糖部しか構造が解明されていないが、その原因の一つは、LPS 多糖部が heteropolysaccharide であり、また生合成過程に基づく LPS 分子間の構造変異が存在するため、通常のゲルクロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーによる多糖鎖の精製が極めて困難なことである。本研究では、HF、無水ヒドラジンおよび KOH 処理によりリン酸と脂肪酸を完全に除去した LPS 多糖鎖をゲルクロマトグラフィー、

イオン交換クロマトグラフィー、さらに HPAEC によって精製し、精製した各多糖鎖は、主に NMR と MS 分析によって構造を決定することができた。O2 と KX-V212 の LPS 多糖部はそれぞれ 9 個および 10 個の多糖で構成される、低分子量の糖鎖であった。O12 LPS 多糖部も 10 個の単糖で構成されることから、腸炎ビブリオの LPS 多糖鎖はいずれも 10 個程度の単糖からなる低分子糖鎖であることが推察された。

第 5 章では、O2 と KX-V212 の LPS 多糖鎖に非還元末端糖として存在する NonIA の、血清学的特異性への関与を検討した。O2 LPS では、NonIA は明らかにその血清学的特異性を決定する主要エピトープとして関与し、さらに NonIA の 7 位の *N*-置換基が抗原活性に大きく影響することが示された。既知血清型では NonIA が存在するのは O2 LPS のみであり、本物質を腸炎ビブリオ O2 の化学的および血清学的同定に応用する有用性が示唆された。

以上本研究では、腸炎ビブリオ LPS に関して種々の知見が得られた。今後、他の血清型 LPS についても同様な構造解析を行うことにより、各血清型の特異性を担うエピトープが解明されれば、腸炎ビブリオのより迅速かつ正確な血清診断が可能になるものと思われる。さらに、OUT 菌株として分離される菌株の中には、新しい血清型菌株が存在する可能性もあり、OUT 菌株の血清学的同定は、特に同一原因菌による感染の防止の観点から重要であると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました 恩師 城西大学 近藤誠一 助教授に衷心より感謝致します。

貴重な菌株を御分与して戴いた 東京都立衛生研究所(故)大橋誠 博士、太田健爾 博士、大阪大学微生物病研究所 の 本田武司 博士、東京都立衛生試験所 甲斐明美 博士 並びに 京都大学東南アジア研究センター 西淵光昭 博士 に深く感謝致します。

また、数々の有益な御助言と御指導を賜りました 城西大学 久恒和仁 名誉教授、井口毅裕 講師、一色恭徳 助手 に心より感謝するとともに、実験に際し、終始御協力頂いた 城西大学 病原微生物学講座 の諸氏に感謝致します。

NMR スペクトルの測定と GC-MS 分析の労をとられました 城西大学 機器センター の諸氏に感謝致します。

また、NMR 測定技術の習得の際に、終始御指導、御鞭撻を賜りました 国立医薬品食品衛生研究所 薮島由二 博士 に深く感謝致します。

多糖鎖の精製の際に、有益な御助言と御指導を賜りました 国立医薬品食品衛生研究所 川崎ナナ 博士 に心より感謝致します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました 副査 城西大学 横江一朗 教授、副査 城西大学 齋藤節生 教授 に深く感謝致します。

実験の部

【実験の部】

一般事項

1. 使用菌株とその培養

本研究で使用した *Vibrio parahaemolyticus* の菌株 O2(T-75-29, K3)、O3(T-77-779-1, K7)、O4 (T-78-60, K8)、O5 (T-77-739, K15)、O11 (Pilot, K36) の菌株は東京都立衛生研究所の(故)大橋誠博士と太田健爾博士より分与された。また O13 (AQ-3204) の菌株は大阪大学微生物病研究所の本田武司博士より分与された。第3章で使用した O2 菌株 V95-269 (O2: K3) は東京都立衛生試験所の甲斐明美 博士より分与された。*V. parahaemolyticus* O-untypeable (OUT) 菌株は京都大学東南アジア研究センターの西瀬光昭博士より分与された。OUT 菌株の由来と分離年および遺伝学的性状を Table 1 に示した。これらの腸炎ビブリオの菌株は 3% NaCl 添加普通ブイヨン培地 (pH 7.2) で 37 °C、14 時間振盪培養し、高圧蒸気滅菌 (120 °C、20 分) 後、遠心分離により集菌した。集めた菌体は蒸留水で 3 回、アセトンで 3 回洗浄後、アセトン乾燥菌体とした。

Table 1 OUT strains isolated from patients

Strain	Country	Source	Year	K antigen	<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh 1</i>	<i>trh 2</i>
90A-6611	USA	wound	1990	KUT ²⁾	+	-	-	-
X-3972	Bangladesh	stool	1982	KUT	+	+	-	-
W-90144	Bangladesh	stool	1981	KUT	+	+	-	-
AK-33473	Bangladesh	stool	1995	61	+	+	-	-
U-6443	Bangladesh	stool	1980	3	+	+	-	-
AD-7999	Bangladesh	stool	1988	KUT	+	+	-	-
	Kansai							
KX-V212	International	stool	1996	KUT	+	-	-	-
	Airport ¹⁾							

1. Possible country of infection : Myanmar.

2. KUT : K antigen untypeable.

2. LPS および LPS 多糖鎖部の調製

2-1. LPS の調製

LPS はアセトン乾燥菌体から Westphal ら [43] の熱フェノール・水法により抽出した。アセトン乾燥菌体 (25 g) に蒸留水 250 mL と 90% フェノール 250 mL を加え、68~70 °C で Ultra turax T25 (JANKE & KUNKEL, Germany) を用いて 5 分間、激しく攪拌した。懸濁液は氷水中 10 °C 以下まで冷却し、遠心分離 (14,000×g、20 分) 後、水層を分取した。得られた水層と同量の蒸留水をフェノール層および菌層に加え、同様な操作をさらに 2 回繰り返した。得られた水層は蒸留水に透析してフェノールを除去した後濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥標品を精製水に溶かし、超遠心分離 (105,000×g、16 時間) により得られた沈渣を凍結乾燥して粗 LPS とした。粗 LPS は精製水に溶解した後、超遠心分離 (105,000×g、3 時間、5 回) による反復洗浄を行い、得られた沈渣を凍結乾燥して精製 LPS (収率 1.0~2.7 %, w/w) とした。

2-2. LPS 多糖鎖部 (OS) の調製

LPS (500 mg) を 5% 酢酸 100 mL に溶かし、100 °C、1.5 時間加熱処理後、遠心分離 (15,000×g、10 分) によりリピド A を除去した。その上清を減圧下に蒸発乾固して LPS の多糖画分である DPS (degraded polysaccharide) とした。DPS を精製水に溶解し、不溶物を遠心除去後、Sephadex G-25 gel-permeation chromatography を行い、OS 画分を得た (O2: 112.5 mg, KX-V212: 124.5 mg)。

3. LPS の化学分析法

3-1. 中性糖

試料 400 µg を 2 M trifluoroacetic acid (TFA) で 120 °C、1 時間加水分解し、減圧下に蒸発乾固した後、xylose (内部標準物質) 40 µg を加え、NaBH₄ で 3 時間還元した。反応液に Dowex 50 (H⁺) を加えて過剰な NaBH₄ を分解し、蒸発乾固した後、ピリジン / 無水酢酸 (1 : 1) 中で 100 °C、30 分間アセチル化してアルジトール・アセテートとし、GC によって分析した。中性糖のアルジトールアセテートは後述した Table 2 のプログラム No. 1 を用いる GC によって分析した。中性糖は各標準物質の GC における相対保持時間と、GC-MS によるマススペクトルに基づいて同定し、内部標準物質とのピーク面積比から定量した。

3-2. アミノ糖

試料 400 μg を 4 M HCl で 100 $^{\circ}\text{C}$ 、16 時間加水分解した後、減圧下に蒸発乾固し、残渣を精製水に溶解して Dowex 50 (H^+) カラムを通過させ、アミノ糖を吸着させた。樹脂は精製水で洗浄した後、2 M HCl で溶出してアミノ糖画分を得た。アミノ糖画分は減圧下に蒸発乾固した後、キシロース(内部標準物質)40 μg を加え、 NaBH_4 で 3 時間還元した。反応液を酢酸で中和し、ピリジン / 無水酢酸 (1:1) 中で 100 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間アセチル化して *N*-アセチル-アルジトール・アセテートとした。アミノ糖のアルジトールアセテートは後述した Table 2 のプログラム No. 1 を用いる GC によって分析した。GC における相対保持時間と GC-MS によるマススペクトルに基づいて同定し、内部標準物質とのピーク面積比から定量した。

3-3. 呈色反応

ウロン酸は標準物質として D-GlcA を用い、Bitter-Müir のカルバゾール・硫酸法 [44] により比色定量した。全リンは標準物質として K_2HPO_4 を用い、Lowry らの方法 [45] により比色定量した。Kdo は Brade ら [46] の過ヨウ素酸/チオバルビツール酸法により比色定量した。標準物質には Sigma 社製 (USA) の Kdo を用いた。

3-4. ウロン酸の同定

OS (1 mg) をメタノール 1 mL に溶かし、カルボキシル基をジアゾメタンでメチル化し、減圧下で蒸発乾固した。カルボキシル基を NaBD_4 で還元した後、反応液は酢酸で中和した。得られた carboxyl-reduced OS を 2 M TFA で 120 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間加水分解した後、前述と同様に、アルジトール・アセテートとして、後述した Table 2 のプログラム No. 2 を用いる GC と GC-MS によって分析した。

3-5. 脂肪酸の分析

400 μg の LPS を 4 M HCl で 100 $^{\circ}\text{C}$ 、4 時間加水分解した。反応液に 5 倍量の H_2O および C19:0(内部標準物質)40 μg を加え、遊離脂肪酸をジクロロメタンで 3 回抽出した。得られたジクロロメタン溶液を蒸留水で洗浄 (3 回) した後、窒素気流下で乾燥した。遊離脂肪酸は 2 M HCl / methanol に溶解し、86 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間 methanolysis した。反応溶液を窒素気流下によって乾燥した後、クロロホルムで抽出 (3 回) し、得られた脂肪酸メチルエステルを後述した Table 2 のプログラム No. 3 を用いる GC および GC-MS により分析した。

3-6. 全メチル化

多糖鎖および FP の全メチル化は Hakomori 法 [47] によって行い、全メチル化糖は、Sep Pak C-18 カートリッジ (Waters Associates, USA) に吸着させ、精製水で洗浄後、メタノールで溶出して精製した。全メチル化糖を 2 M TFA で 120 °C、1 時間加水分解した後、NaBH₄ で 16 時間還元し、アセチル化した。反応生成物をクロロホルムに溶解し、ジアゾメタンを加えてカルボキシル基をメチル化した後、後述した Table 2 のプログラム No.2 を用いる GC および GC-MS により分析した。

3-7. 絶対配座の決定

Hex, HexA および HexN の絶対配座の決定は Gerwing [48] らの方法に従った。各構成糖の *O*-acetyl-S-(+)- および R-(-)-2-butylglycoside を GC-MS によって、標準品 (D 体) 同誘導体との比較により決定した。

4. 機器分析条件

4-1. GC および GC-MS

GC による分析には Table 2 に示したキャピラリーカラムと温度プログラム条件を用いた。

GC-MS は JMS-700 (JEOL) により HR-52 カラムを使用して行った。分析の温度プログラムは、試料を GC で分析する際に使用したプログラムと同じものを用いた。EI-MS (Electron impact mass spectrometry) は加速電圧 70 eV で測定し、CI-MS (Chemical ionization mass spectrometry) の活性化ガスにはイソブタンを用いた。

Table 2. GC および GC/MS 条件

プログラム No.	カラム	初期温度 (°C)	初期温度保持時間 (min)	昇温速度 (°C/min)	Injection 温度 (°C)
1	DB210 ^a	180~240	3	5	250
2	HR52 ^b	150~320	3	5	250
3	HR52	150~240	3	3	250

a: DB210 (0.25 mm×30 m, J & W Scientific, Ca. USA), b: HR52 (0.25 mm×25 m, Shinwa Chemical Industries Ltd, Kyoto), ガスクロマトグラフ: Shimadzu GC-14A, キャリアガス: 窒素, 検出器:水素炎イオン化型検出器 (FID).

4-2. MALDI TOF-MS

装置は 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystem, USA) を使い、TOF configuration は reflector mode により測定し、極性は negative ion mode で行った (加速電圧 20 kV)。試料を精製水に溶かし (10~40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、Dowex 50(H^+)で脱塩した後、等量の matrix (0.5 M 2,5-dihydroxybenzoic acid, Wako) 溶液を加え、ステンレス製ホルダー にスポットして測定した。キャリブレーションは Proteomass & protein MALDI-MS calibration Kit (SIGMA, USA) を用いて行った (Table. 3)。

Table 3. Calibration Kit (Peptide range; Sigma)

Product	Formula (M)	[M-H] ⁻ monoisotopic (average)
Bradykinin fragment 1-7	$\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_9$	755.3840
Angiotensin II (human)	$\text{C}_{50}\text{H}_{71}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$	1044.5267
P14R (synthetic peptide)	$\text{C}_{76}\text{H}_{112}\text{N}_{18}\text{O}_{16}$	1531.8425
ACTH fragment 18-39 (human)	$\text{C}_{112}\text{H}_{165}\text{N}_{27}\text{O}_{36}$	2463.1832
Insulin oxidized B chain (bovine)	$\text{C}_{157}\text{H}_{232}\text{N}_{40}\text{O}_{47}\text{S}_2$	3492.6375
Insulin (bovine)	$\text{C}_{254}\text{H}_{377}\text{N}_{65}\text{O}_{75}\text{S}_6$	5728.5930

4-3. FAB-MS

装置は JMS-700 を用いた。試料は 0.1 % の TFA に溶解し、マトリックスには グリセロールを用いた。測定は positive ion mode で行った。

4-4. NMR spectroscopy

装置は JEOL A-500 (^1H : 500.00 MHz, ^{13}C : 125.65 MHz)、JEOL A-600 (^1H : 600.05 MHz, ^{13}C : 150.80 MHz) および JEOL ECA 800 (^1H : 800.14 MHz, ^{13}C : 201.20 MHz) を使い、測定温度 30.0 °C、pD 6.9 で測定した。試料はすべて D_2O に溶解し、管内は窒素ガスで置換した。内部標準物質にはアセトンを用い、これを δ_{H} 2.225、 δ_{C} 31.45 ppm とした。測定管は 3 または 5 mm 管 (液高 3mm: 3 cm, 5 mm: 4 cm) を用いた。TOCSY スペクトルは mixing time 60 および 90 ms で、NOESY スペクトルは mixing time 0.5 s および 1 s でそれぞれ測定した。また、COSY スペクトルは 2048×2048 data point、その他の 2D NMR スペクトルは 2048×1024 data point でフーリエ変換した。

5. クロマトグラフィー

5-1. ゲルクロマトグラフィー

カラムは Sephadex G-25 (2.6×100 cm, Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden) を使用し、精製水またはピリジン/酢酸/精製水 (8 / 5 / 2000, 36 mL/hr) で溶出した。検出器は示差屈折率計 (RID-6A, Shimadzu) を用いた。

5-2. イオン交換クロマトグラフィー

カラムは DEAE Sphacel (1.6×20cm, Pharmacia) を使用した。試料を注入後、カラムを 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) buffer (40 mL) で洗浄し、0~500 mM または 0~300 mM NaCl の linear gradient (Total volume 200 mL) で溶出 (20 mL/hr) した。ピークの検出はフェノール/硫酸法 [49] で行った。

5-3. HPLC

装置は LC-6A (Shimadzu, Kyoto) を用いた。カラムは YMC-pack ODS-AQ (6.0×300 mm, analytical column, YMC) を使用し、メタノール/精製水 (5 / 995, 1 mL/min) で溶出した。検出器は示差屈折率計を用いた。

5-4. HPAEC

装置は DX-300 (Dionex, CA, USA) を用いた。カラムは同社製の専用カラム、CarboPac PA1 (4.0×250 mm, analytical column) を使用した。溶離液は 100 mM NaOH 溶液を定流下、130~150 mM (PS1) または 200~250 mM (PS1') NaOAc の linear gradient で溶出した (1 mL/min)。

1. 第1章に関する実験

1-1. Kdo-リン酸の検出

LPS (3 mg) を 1 M HCl / メタノール中で 86 °C、2 時間、メタノリシスした後、減圧下に蒸発乾固した。メタノリシス産物はピリジン/無水酢酸 (1 : 1) でアセチル化した。反応生成物をクロロホルムに溶解し、ジアゾメタンを用いて再度メチルエステル化し、得られた Kdo-リン酸の *O*-acetyl-methylester-methylketoside は、Table 2 に示したプログラム No.2 を用いる GC および GC-MS により分析した。

1-2. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

LPS の SDS-PAGE は Tsai と Frasch の方法 [50] に従った。17.5 % ポリアクリルアミドゲルと泳動用緩衝液 (0.192 M グリシンと 0.1 % SDS を含む 0.025 M トリス / 塩酸緩衝液、pH 8.3) を用い、30 mA の定電流にて 2~3 時間泳動した。泳動後、銀染色キット (第一化学薬品) を用いて銀染色した。

1-3. 抗血清の調製

V. parahaemolyticus O1 から O11 の抗血清は腸炎ビブリオ血清型別用免疫血清 (DENKA SEIKEN Co. Ltd.) を用いた。O12、O13 および OUT 菌株に対する全菌抗血清は、Shimada と Sakazaki の方法 [51] に従い、家兎を免疫して調製した。各菌株を 3 % NaCl 添加ハートインフュージョン培地で 37 °C、16 時間培養し、高圧蒸気滅菌 (120 °C、20 分) 後、滅菌生理食塩水で洗浄した菌体を、620 nm における濁度が 0.1 (2×10^8 個/mL) になるように滅菌生理食塩水に懸濁したものを抗原液として用いた。抗原液の 0.5、1.0、2.0、4.0 mL をそれぞれ 4 日間隔で家兎の耳静脈内に投与し、最終投与から 1 週間後に抗原液 4.0 mL を追加投与した。追加投与して 1 週間後に心臓穿刺により全採血し、抗血清を得た。

1-4. 受身溶血試験

受身溶血 (PH) 試験は Hisatsune らの方法 [52] に従って行った。PH 試験に用いた感作赤血球は、後述の緩衝液で洗浄したヒツジ赤血球 (SRBC) の packed cell (SRBC 浮遊液を 2,500 rpm で 10 分間遠心分離して沈澱させたもの) 0.1 mL に、0.175 mL のアルカリ処理 (0.25 M NaOH、56 °C、1 時間) LPS (1 mg/mL) と 0.425 mL の緩衝液を加え、37 °C で 30 分間インキュベートして調製した。PH 試験は 100 倍希釈抗血清の 2 倍希釈列 0.2 mL に 0.5 % の LPS 感作 SRBC 浮遊液 0.2 mL および 10 倍希釈のモルモット補体 (乾燥補体、極東製薬工業) 20 μ L を加えて 37 °C で 30 分間反応させた後、1.0 mL の緩衝液を加えて遠心分離し、上清の 413 nm における吸光度を測定 (V-530 UV / VIS spectrophotometer、日本分光) して % 溶血を求めた。溶血対照と非溶血対照には抗血清の代わりにそれぞれ精製水と緩衝液を用いた。溶血価は各血清の 50 % 溶血を示す希釈倍率で表した。PH 試験における SRBC の洗浄と希釈、抗血清の希釈および抗原液の調製には 0.15 mM CaCl_2 、0.5 mM MgCl_2

および 0.83 % NaCl を含む 0.25 mM バルビツール酸緩衝液 (pH 7.3) を用いた。

1-5. 凝集反応と吸収抗血清の調製

凝集反応と吸収抗血清の調製は Sakazaki と Donovan の方法 [53] に従って行った。3 % NaCl 添加ハートインフュージョン培地で培養した各菌株を滅菌生理食塩水に懸濁し、100 °C、1 時間加熱処理した後、滅菌生理食塩水で 3 回洗浄した。菌体を 620 nm における濁度が 1.0 になるように滅菌生理食塩水に懸濁し抗原液とした。凝集反応は 50 μ L の抗血清の 2 倍希釈列に 50 μ L の抗原液を加え、50 °C、14 時間反応させた後判定した。抗血清の希釈には 0.425 % 滅菌食塩水を用いた。吸収血清の調製には前述と同様に培養し、加熱処理後、洗浄した菌体を用いた。この菌体に全菌抗血清を加えて懸濁し、50 °C、30 分間反応させた反応液を遠心分離 (10,000 \times g、15 分) し、吸収抗原を除去した。この操作を 3 回繰り返し、最後の遠心上清を吸収血清として血清学的実験に供した。

2. 第 2 章に関する実験

2-1. FP の分離と精製

LPS (500 mg) を 5 % 酢酸に溶かし (10 mg/mL)、100 °C、1.5 時間加水分解後、遠心分離 (15,000 \times g, 10 min) により lipid A を除去した。その上清を Sephadex G-25 ゲルクロマトグラフィー (溶離液: ピリジン / 酢酸 / 精製水) を行い、FP 画分を得た (O2-FP: 28.8 mg, OUT-FP: 39.5 mg)。さらに FP 画分は HPLC によって精製した (O2-FP: 5.8 mg, OUT-FP: 6.5 mg)。

2-2. Ala の絶対配座の決定

Ala の絶対配座の決定は Gerwing らの方法 [48] に従った。OUT-FP を 2 M HCl / S-(+)- および R-(-)-2-butanol 中で 86 °C、1 時間、butanolysis し、蒸発乾固後、全アセチル化した。得られた Alanine の *N*-acetyl-S-(+)- および R-(-)-2-buthylester を標準品 (D、L 体) の同誘導体とリテンションタイムを比較することにより決定した。

2-3. FP の NMR 解析

$^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、PDQF-COSY、PHSQC、HMBC および Gated $^{13}\text{C-NMR}$ 測定は JEOL A-500 を用いてを行った。測定管は 5 mm 管を用いた。プローブは JEOL FG-TH5 (5 mm) を使用した。

2-4. FP の GC と GC-MS

FP をメタノールに溶解し、ジアゾメタンを加えてカルボキシル基をメチル化した後、 NaBD_4 で 16 時間還元した。反応生成物を Hakomori 法によって全メチル化した後、Table 2 に示したプログラム No. 2 を用いる GC および GC-MS により分析した。

3. 第3章に関する実験

3-1. LPS の化学処理

3-1-1. 脱リン酸

LPS (800 mg) を 50 % HF に懸濁 (50 mg/mL) させ、4 °C で 48 時間攪拌した。反応液は 5 倍量の冷水で希釈し、氷水中で 15 % アンモニア水を徐々に加えて中和した後、蒸留水に透析した。透析内液を濃縮後、凍結乾燥して脱リン酸 LPS (HF-LPS, 648 mg) とした。HF-LPS を精製水に溶解 (40 mg/mL) し、 NaBH_4 (12.5 mg/mL) を加えて 55 °C で 16 時間反応させ、lipid A backbone の還元末端の GlcN を還元した。還元後、酢酸で中和して蒸留水に透析し、透析内液を凍結乾燥して HF-LPSred とした (632 mg)。

3-1-2. HF-LPSred の脱 O-アシル化

脱 O-アシル化は Holst ら [54] の方法に従った。HF-LPSred (500 mg) を無水ヒドラジンに溶解 (20 mg/mL) し、37 °C で 1 時間攪拌した。氷水中で冷却した反応液に 10 倍量の冷アセトンを徐々に加えて過剰の無水ヒドラジンを分解した後、生成した沈殿物を遠心分離 (12,000×g, 10 分) により回収した。得られた沈渣は冷アセトンによる反復洗浄 (3 回) を行った後、凍結乾燥して de-O-acylated HF-LPSred (224 mg) とした。MALDI-TOF MS で用いた de-O-acylated LPS は LPS から同様

の処理によって調製した。

3-1-3. 脱 *N*-アシル化

脱 *N*-アシル化は Holst ら [54] の方法に従った。De-*O*-acylated HF-LPS red (200 mg) を 4 M KOH に溶解 (25 mg/mL) し、加熱処理中の酸化的脱アミノ化を防ぐために 10 分間、容器内を窒素ガスで置換した。溶解液を 100 °C で 16 時間加熱した後、遠心分離 (3,000×g, 10 分) により沈渣を除去した。その遠心上清は 1 M HCl で pH 6.0 に調整し、遊離脂肪酸を 10 倍量の クロロホルムで抽出除去 (3 回) した。得られた水相を凍結乾燥後、水に溶解し、Sephadex G-25 ゲルクロマトグラフィー (溶離液: 精製水) によって deacylated HF-LPSred (56.8 mg) を得た。

3-2. Deacylated HF-LPSred の精製

Deacylated HF-LPSred (50 mg) は DEAE Sephacel による陰イオン交換クロマトグラフィーと HPAEC によって分画し、得られた画分は Sephadex G-25 ゲルクロマトグラフィー (溶離液: 精製水) によって脱塩し精製した (PS1: 5 mg, PS2: 1 mg)。

3-3. NMR 測定

¹H-NMR の測定は JEOL A-500 および ECA 800 で、¹³C-NMR および Gated ¹³C-NMR は A-600 で、2D-NMR は ECA 800 を用いて測定した。測定管は A-500 および ECA 800 は 5 mm 管を、A-600 は 3 mm 管を用いた。A-500 のプローブは JEOL FG-TH5 (5 mm) を、A-600 のプローブは NALORAC TH3FG (3 mm) を、ECA 800 のプローブは JEOL FG-HX-800 (5 mm) を用いた。ECA 800 のシム調整は Spin 系 (Z1~Z6) では gradient shim を使用した。

4. 第 4 章に関する実験

4-1. LPS の化学処理

4-1-1. 脱リン酸

LPS の脱リン酸化は前述と同様に行った。LPS (800 mg) を HF 処理後、中和および透析し、透析内液を凍結乾燥して HF-LPS (658 mg) とした。HF-LPS を還元後、

蒸留水に透析し、透析内液を凍結乾燥した (HF-LPSred, 654 mg)。

4-1-2. HF-LPSred の脱 *O*-アシル化

HF-LPSred の脱 *O*-アシル化は前述と同様に行った。HF-LPSred (500 mg) を無水ヒドラジン処理後、冷アセトンを加えて過剰の無水ヒドラジンを分解した。生成した沈殿物を遠心分離により回収し、反復洗浄後、凍結乾燥して de-*O*-acylated HF-LPSred (278 mg) を得た。MALDI-TOF MS で用いた de-*O*-acylated LPS は LPS を同様に処理して調製した。

4-1-3. *N*-脱アシル化

de-*O*-acylated HF-LPSred の脱 *N*-アシル化は前述と同様に行った。Deacylated HF-LPSred (200 mg) を 4 M KOH を加熱処理した後、遠心分離により沈渣を除去した。その遠心上清から遊離脂肪酸を除去後、得られた水相を凍結乾燥後、水に溶解し、ゲルクロマトグラフィー (溶離液: 精製水) によって deacylated HF-LPSred (57.2mg) を得た。

4-2. Deacylated HF-LPSred の精製

Deacylated HF-LPSred は DEAE Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィーと HPAEC によって分画し、得られた画分は Sephadex G-25 カラムによって脱塩を行なって精製した。(収率 O2: PS1': 1 mg、その他の画分: <0.1 mg)。

4-3. Deacylated lipid A backbone の調製

LPS (100 mg) を 5 % 酢酸に溶かし (10 mg/mL)、100 °C、1.5 時間加水分解後、遠心分離 (15,000×g, 10 min) により lipid A を分画し、蒸留水で洗浄 (3 回) 後、凍結乾燥した (46.5 mg)。得られた lipid A を上述と同様に脱 *O*-、*N*-アシル化した後、ゲルクロマトグラフィー (溶離液: 精製水) により精製した (6.8 mg)。

4-4. NMR 測定

NMR スペクトルは JEOL ECA 800 を用いて測定した。¹³C-NMR および Gated ¹³C-NMR は A-600 を用いて測定した。A-600 のプローブは NALORAC TH3FG (3

mm) を、ECA 800 のプローブは JEOL FG-HX-800 (3 mm) を用いた。ECA 800 のシム調整は Spin 系 (Z1~Z6) では gradient shim を使用した。PHSQC-TOCSY スペクトルは 90 ms の mixing time で測定した。³¹P-NMR スペクトルの測定は JEOL A-500 (202.35 MHz) を用い、内部標準物質には 85 % リン酸水溶液 (0.00 ppm) を使用した。

5. 第5章に関する実験

5-1. 抗血清の調製

全菌抗血清は前述と同様の方法により調製した。

5-2. ELISA 試験および ELISA 阻止試験

ELISA および ELISA 阻止試験は Bartodziejska らの方法 [55] に従った。また、ELISA および ELISA 阻止試験には、以下の buffer を使用した。

抗原希釈および洗浄用 buffer: NaCl/Pi (150 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.2)

ブロッキング および 1 次抗体希釈用 buffer: 2.5 % casein NaCl/Pi

2 次抗体希釈用 buffer: 5 % BSA (Aldrich, USA) in NaCl/Pi

酵素反应用 buffer: 100 mM Sodium citrate, pH 4.5

5-2-1. ELISA

プレートは 96 穴 Maxisorp microtitre U-bottom plate (Nunc, Denmark) を用い、発色剤として 2,2'-azinodi-3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid を使用し、精製水に用時溶解 (1 mg/mL) した。

抗原を NaCl/Pi (10 ng/μL) に溶解し、各ウェルに 50 μL (500 ng/well) をコートし、4 °C で 16 時間インキュベートした。プレートを NaCl/Pi で 4 回洗浄後、非特異結合部位を 2.5 % casein NaCl/Pi (50 μL) で 37 °C で 1 時間ブロッキングした。前述と同様に洗浄後、1 次抗体の 3 倍希釈液 (50 μL) を加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。洗浄後 1000 倍希釈 2 次抗体 (50 μL) を加えて 37 °C で 1 時間、インキュベートした後、NaCl/Pi で 3 回、酵素反应用 buffer で 1 回洗浄した。各ウェルに発色剤溶液 (50 μL) および 0.1 % H₂O₂ (25 μL) を加えた後、37 °C で 30

分反応させた。反応は 50 μ L の 2 % oxalic acid を添加して停止させ、混合した後、Plate reader (Bio-Rad, USA)を用いて測定し、405 nm における吸光度が 0.2 を示す 1 次抗体の希釈倍率を抗体価とした。

5-2-2. ELISA 阻止試験

Inhibitor の 10 倍希釈列は NaCl/Pi で作成し、ELISA 阻止試験のための 1 次抗体は、ELISA によって 405nm における吸光度が 1.2 を示す希釈倍率に調製したものをを用いた。マイクロプレート [V-sharped microtitre plate (Nunc)] の各ウェルに 50 μ L ずつの抗原 (inhibitor) の 10 倍希釈列を作成し、次いで 50 μ L の 1 次抗体を加え、混合した後、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。反応溶液 50 μ L を ELISA の 1 次抗体として用い、以下、前述と同様の操作を行った。各 inhibitor の阻害活性は inhibitor を含まない場合の吸光度を 0 %、1 次抗体を含まない場合の吸光度を 100 % として、50 % の阻害活性を示す inhibitor の濃度 (μ g/mL) で表した。

【引用文献】

1. Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T., Ueho, T. *Med. J. Osaka Univ.*, **1953**, 4, 229-304.
2. 厚生省生活衛生局食品保健課. 平成 13 年度食中毒発生状況, 社団法人 日本食品衛生協会 (監修), *食品衛生研究*, **2001**, 第 52 卷, 第 9 号, 118-203.
3. 島田俊雄. 腸炎ビブリオ. *INFECTION CONTROL*, **1997**, 6, 46-50.
4. Naim, R., Yanagihara, I., Iida, T., Honda, T. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2001**, 195, 2, 237-244.
5. Honda, T., Takeda, Y., Miwatani, K., Kato, K. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, **1976**, 50, 216-223.
6. Terada, T., Yokoo, Y. *Jpn. J. Bacteriol.* **1972**, 27, 35-41.
7. Miwatani, T., Takada, Y. Saikon Publishing Co. Ltd., Tokyo. **1976**.
8. Ishibashi, M., Kinoshita, Y., Shinbara, T., Kunita, N., Takeda, Y., Miwatani, T. *Jpn. J. Bacteriol.* **1979**, 34, 395-401.
9. Ishibashi, M., Kinoshita, Y., Yanai, Y., Abe, H., Takeda, Y., Miwatani, T. *Jpn. J. Bacteriol.* **1980**, 35, 701-706.
10. Wilkinson, S. G.. In Sutherland, I. W. (ed.), Academic Press, New York. **1977**, p. 97-175.
11. Brade, H., Galanos, C. *J. Med. Microbiol.* **1983**, 16, 203-210.
12. Brade, H., Galanos, C. *Infect. Immun.* **1983**, 42, 250-256.

13. Hitchcock, P. J., Leive, L., Mäkelä, J., Rietschel, E. Th., Strittmatter, W., Morrison, D. C. *J. Bacteriol.* **1986**, 166, 699-705.
14. Hisatsune, K., Kiue, A., Kondo, S. *Microbiol. Immunol.* **1980**, 24, 691-701.
15. Hisatsune, K., Iguchi, T., Haishima, Y., Tamura, N., Kondo, S. *Microbiol. Immunol.* **1993**, 37, 143-147.
16. Miyano, K., Ishibashi, M., Kunita, N., Takeda, Y., Miwatani, T. *FEMS Microbiol. Lett.* **1980**, 8, 23-28.
17. Kondo, S., Haishima, Y., Hisatsune, K. *Carbohydr. Res.* **1992**, 231, 55-64.
18. Weissbach, A., & Hurwitz, J. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 705-709.
19. Kondo, S., Zähringer, U., Rietschel, E. Th., Hisatsune, K. *Carbohydr. Res.* **1989**, 188, 97-104.
20. Kondo, S., Zähringer, U., Seidel, U., Sinnwell, V., Hisatsune, K., Rietschel, E. Th. *Eur. J. Biochem.* **1991**, 200, 689-698.
21. Kondo, S., Haishima, Y., Hisatsune, K. *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, 68: 155-158.
22. Kondo, S., Haishima, Y., Hisatsune, K. *Microbiol. Immunol.* **1991**, 35, 675-680.
23. Iguchi, T., Kondo, S., Hisatsune, K. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 130, 287-292.
24. Miller, V. L., Taylor, R. K., Mekalanos, J. J. *Cell.* **1987**, 48 (2), 271-279.
25. Kim, Y. B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, 37 (4), 1173-1177.
26. Tsvetkov, Y. E., Shaskov, A., Knirel, Y. A., Zähringer, U. *Carbohydr. Res.* **2001**, 335,

221-243.

27. Knirel, Y. A., Vinogradov, E. V., L'vov, V. L., Kochearova, N. A., Shashkov, A. S., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.* **1984**, 133, C-5-C-8.
28. Knirel, Y. A., Vinogradov, E. V., Shashkov, A. S., Kochetkov, N. K., Kochearova, N. A., L'vov, V. L., Dmitriev, B. A. *Carbohydr. Res.* **1985**, 141, C-1-C-3.
29. Knirel, Y. A., Vinogradov, E. V., Shashkov, A. S., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K., Stanislavsky, E. S., Mashilova, G. M. *Eur. J. Biochem.* **1987**, 163, 627-637.
30. Knirel, Y. A., Rietschel, E. Th., Marre, R., Zähringer, U. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 221, 239-245.
31. Knirel, Y. A., Moll, H., Helbig, J. H., Zähringer, U. *Carbohydr. Res.* **1997**, 304, 77-79.
32. Knirel, Y. A., Grosskurth, H., Helbig, J. H., Zähringer, U. *Carbohydr. Res.* **1995**, 279, 215-226.
33. Edebrink, P., Jansson, P. E., Bogwald, J., Hoffman, J. *Carbohydr. Res.* **1996**, 287, 225-245.
34. Haseley, S. R., Wilkinson, S. G. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 250, 617-623.
35. Vinogradov, E. V., Shashkov, A. S., Knirel, Y. A., Kochetkov, N. K., Dabrowski, J., Grosskurth, H., Stanislavsky, E. S., Kholodkova, E. V. *Carbohydr. Res.* **1992**, 231, 1-11.
36. Nazarenko, E. L., Shashkov, A. S., Knirel, Y. A., Ivanova, E. P., Ovodov, Y. S. *Biochemistry (Moscow)*. **1990**, 16, 1426-1429.
37. Beynon, L. M., Richards, J. C., Perry, M. B. *Carbohydr. Res.* **1994**, 256, 303-317.

38. Kondakova, A. N., Perepelov, A. V.; Bartodziejska, B.; Shashkov, A. S.; Senchenkova, S. N.; Wykrota, M.; Knirel, Y. A.; Rozalski, A. *Carbohydr. Res.* **2001**, 333, 241-249.
39. Tsvetkov, Y. E., Shashkov, A, Knirel, Y. A., Zähringer, U. *Carbohydr. Res.* **2001**, 331, 233-238.
40. Knirel, Y. A.; Kocharova, N. A.; Shashkov, A. S.; Dmitriev, B. A.; Kochetkov, N. K.; Stanislavsky, E. S.; Mashilova, G. A. *Eur. J. Biochem.* **1987**, 163, 639-652.
41. Müller-Loennies, S., Holst, O., Linder B., Brade, H. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 245, 235-249.
42. Kondo, S., Watabe, T., Haishima, Y., Hisatsune, K. *Carbohydr. Res.* **1993**, 62, 353-359.
43. Westphal, O., Lüderitz, O., Bister, R. *Z. Naturforsch.* **1952**, 7b, 148-155.
44. Bitter, T., Müir, H. M. *Anal. Biochem.* **1962**, 4, 330-334.
45. Lowry, O. H., Roberts, N. R., Leiner, K. Y., Wu, M. L., Farr, A. L. *J. Biol. Chem.* **1954**, 207, 1-17.
46. Brade, H., Galanos, C., and Lüderitz, O. *Eur. J. Biochem.* **1983**, 131, 195-200.
47. Hakomori, S. *J. Biochem. (Tokyo)* **1964**, 55, 205-208.
48. Gerwing, G., Kamering, J. P., Vliegthart, J. F. G.. *Carbohydr. Res.* **1978**, 62, 349-357.
49. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Gebers, P. A., Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350-356.
50. Tsai, C. M., Frasch, C. E. *Anal. Biochem.* **1982**, 119, 115-119.

51. Shimada, T., Sakazaki, R. *Jpn J. Med. Sci. Biol.* **1973**, 31, 181-184.
52. Hisatsune, K., Kondo, S., Kobayashi, K. *Jpn J. Med. Sci. Biol.* **1978**, 31, 181-184.
53. Sakazaki, R., Donovan, J. *Methods in microbiology*, **1984**, 16, 271-289.
54. Holst, O., Müller-Loennies, S., Lindner, B., Brade, H. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214, 695-701.
55. Bartodziejska, B., Shashkov, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 259, 212-217.

