

O1コレラ菌のO抗原因子A, BおよびCに関する
化学的・免疫化学的研究

甲第8号

1994年

一 色 恭 徳

O1コレラ菌のO抗原因子A, BおよびCに関する
化学的・免疫化学的研究

1994年

一 色 恭 徳

目次
(総論の部)

序論	1
第 1 章 O 1 コレラ菌のグループ抗原因子 A とイナバ抗原因子 C の解析	9
第 1 節 Non-O 1 コレラ菌 Hakata と <i>Y. enterocolitica</i> O9 との血清学的交叉反応原性	10
第 2 節 人工 LPS 抗原の調製とその化学的性状	12
第 3 節 人工 LPS 抗原の血清学的性状	23
第 4 節 O30 群 <i>Salmonella</i> および <i>E. coli</i> O157 と イナバ型 O 1 コレラ菌および Non- O 1 コレラ菌 Hakata との血清学的交叉反応原性	32
考察	38
第 2 章 オガワ特異抗原因子 B の解析	40
第 1 節 O 1 コレラ菌 LPS を用いたオガワ 特異構成糖の発見とその同定	41
第 2 節 海水ビブリオ 1875 LPS を用いた Original 特異構成糖の発見とその同定	47
第 3 節 O 1 コレラ菌および海水ビブリオ 1875 LPS の オガワ特異構造の解析	51
考察	58
総括	62
謝辞	65

(実験の部)

一般事項	・・・・・・・・	66
第 1 章に関する実験	・・・・・・・・	71
第 2 章に関する実験	・・・・・・・・	75
引用文献	・・・・・・・・	77

総論の部

序 論

コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) は、猛烈な下痢を主症状とする急性伝染病”コレラ”の原因菌として1883年 Robert Kochらによって初めて分離された。コレラ菌は分類学的には、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (第9版) [1]において、Family II. *Vibrionaceae*, Genus I. *Vibrio*, Species I. *Vibrio cholerae* として分類されている。本菌は、生物学的性状の相違からアジア型または古典型 (Biotype *cholerae*) とエルトール型 (Biotype *eltol*) の2つの生物型に分類されている。Biotype *cholerae* は、インド・ベンガル地方を原発地として起こったコレラの第1次から第6次までの世界的大流行 (Pandemy) の原因菌である。また、Biotype *eltol* はインドネシアのセレベス島に端を発する第7次世界大流行の原因菌であり、現在もなお東南アジアはもとよりアフリカや南アメリカにおいて猛威を振るっている。コレラは、元来インド亜大陸ことにベンガル地方における風土病であった。しかし、前述の様にコレラは大航海時代以来たびたび全世界的な規模で大流行を繰り返し、コレラ流行の制圧、ことにコレラワクチンの開発などは他の感染症に比べて立ち後れているのが現状である。さらには、近代になって交通機関の発達とそれに伴う流行地域への旅行者の増大や、これら感染地域からの生鮮食料品の輸入の増加などによって、通常はコレラの流行が見られない先進国においても輸入感染症として流行する事例も少なくない。我が国においても、過去何回かの大小の流行を繰り返したが、その規模は小さくなり”復員コレラ”を最後にコレラは影をひそめたかのように見えた。しかし、近年、輸入生鮮食品や海外旅行者によるコレラがあいついで発生し、その中でも平成3年千葉・神奈川を中心とするコレラ集団発生は記憶に新しい。

コレラ菌は、耐熱性の菌体表層抗原であるO抗原の相違によってO1グループと Non-O1グループに大別される [2]。前述の急性伝染病”コレラ”の原因菌はO1グループ・コレラ菌 (O1コレラ菌) であり、本邦において”コレラ菌”とはこのO1コレラ菌を指す。更に、O1コレラ菌は、その生物型とは無関係にオガワ型 (オガワ) とイナバ型 (イナバ) の2つのO抗原型 (血清型) に細分類されている。O1コレラ菌のO抗原は、グループ抗原因子A、オガワ特異抗原因子Bおよびイナバ抗原因子Cの3つの抗原因子から構成されており、オガワおよ

O1 <i>Vibrio cholerae</i>					
	Ogawa	A	B	(c)	
	Inaba	A		C	
Marine vibrio					
	bio-serogroup 1875				
	Original		B	(c)	D E
	Variant			C	D E
	<i>V. fluvialis</i> 181-86 Kobe			C	D E
	Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup Hakata			C	D F G

Fig. 1 Antigenic structures of O1 *Vibrio cholerae*, Marine vibrio bio-serogroup 1875, *V. fluvialis* 181-86 Kobe and non-O1 *V. cholerae* serogroup Hakata

びイナバのO抗原構造はそれぞれ A・B・(c) および A・Cの抗原式によって表されることが菌体凝集反応と凝集素吸収試験によって確立されている (Fig.1)。これは、O1 コレラ菌のO抗原構造に関する ABC conceptとして広く支持されている [3,4]。しかしながら、これら3つの抗原因子は、あくまでも血清学的概念であって決して化学的概念ではない。一方、Non-O1グループ・コレラ菌 (Non-O1 コレラ菌) は、生物学的にはO1 コレラ菌と同一であるが、“コレラ”の原因菌とはならず衛生行政上O1 コレラ菌とは区別されていた。しかし近年、インド亜大陸を中心とするコレラ流行の原因菌として、138種におよぶ既知のO抗原型コレラ菌とは一致しない新しいコレラ菌、すなわち新抗原型 (O139) Non-O1 コレラ菌が分離され、その衛生行政上の取扱が問題となっている [5,6,7]。

グラム陰性細菌のO抗原の本体は、化学的には細胞壁外膜に局在するO抗原リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) である。LPSは、それが由来する菌株のO特異性 (血清学的O抗原特異性) を決定するのみならず、内毒素として発熱原性、致死毒性などの多彩な生物活性を有する。LPSは、Fig. 2に示したように基本的にはO抗原多糖側鎖部、コアと称せられるオリゴ糖部およびリピドAの3つの部分から構成されている。O抗原多糖側鎖部は、一般に数個のオリゴ糖からなる repeating unitの反復によって構成され、その構成糖質の種類と結合様式によってO抗原特異性が決定される [8]。脂質部分であるリピドAは内毒素活性の中心であり、コアオリゴ糖はO抗原特異多糖側鎖部とリピドA部分を結合し、天然に

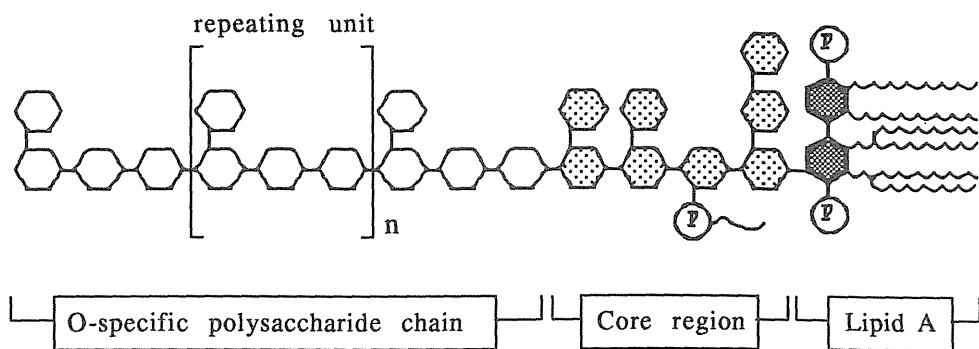


Fig. 2 Schematic structure of bacterial lipopolysaccharide (LPS)

は希少な糖質である2-keto-3-deoxyoctonic acidや L-glycero-D-manno-heptose および glucose、fructose、glucosamine などの糖質から構成され、化学的には同種菌株間においてほとんど共通な構造を持っている。

O1 コレラ菌 LPSのO抗原特異多糖側鎖部の構造は、Redmond [9]、Kenne ら [10] および Hisatsuneら [11]により LPSから弱酸加水分解によって調製した多糖部を用いてガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーおよび核磁気共鳴スペクトル等の手法によって検討された。その結果、オガワおよびイナバ型の両血清型O1 コレラ菌 LPS のO抗原特異多糖側鎖部は共に、3-deoxy-L-glycero-tetronic acid (S-2,4-dihydroxybutyric acid)で N-acyl 化された perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-D-mannose) の α (1→2)結合 homopolymer とその還元末端部に結合した1分子の N-acetylquinovosamine (2-acetamido-2,6-dideoxy-D-glucose)から構成されていることが明らかにされた (Fig. 3)。更に、Kondo [12] は、perosamine homopolymerを欠くイナバ型O1 コレラ菌のSemi-rough型変異株である V. cholerae tox-101-TI-N4株 LPS (即ち、O抗原特異多糖側鎖が1分子の N-acetylquinovosamineで構成されている)の血清学的性状を検討した結果、同 LPS はO1 コレラ菌の血清学的特異性を発現しないことを報告した。また、Hisatsune ら [13] および Kaca ら [14]は、オガワとイナバの両菌株O1 コレラ菌 LPSの化学構造と血清学的特異性に及ぼす過ヨウ素酸処理の影響を検討し、両 LPS は、過ヨウ素酸処理によってそのコアオリゴ糖を構成する fructose と glu-

coseを完全に失い、また LPS 1分子当たり 3 分子存在する L-glycero-D-manno-heptose の 2/3を失うが、その血清学的特異性は損なわれていないことを報告した。このことは、オガワおよびイナバの O1 コレラ菌の O 抗原特異性を決定する部位は perosamine homopolymer 上にあることを示している。しかしながら、O1 コレラ菌の O 抗原を構成する 3 つの O 抗原因子のそれぞれの抗原特異性を発現する LPS 分子上の化学構造は未だ解明されていない。更に、Hisatsune ら [15] および Tokunaga ら [16] は、O1 コレラ菌 LPS がマウスの腹腔内投与によって高い抗菌抗体、すなわちビブリオサイダル抗体を惹起することに着目し [2]、O1 コレラ菌 LPS・コレラトキソイド複合体のマウス腹腔内および経口投与における抗菌・抗毒素抗体の産生能を検討した。その結果、同複合体は、両投与方法において

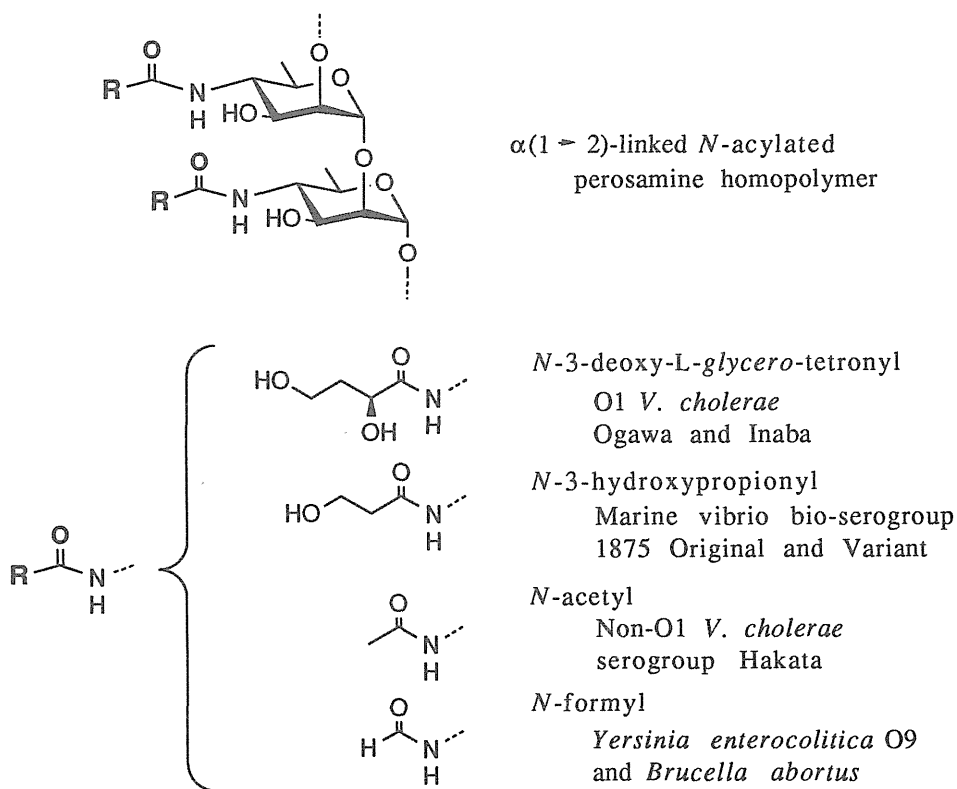


Fig. 3 *N*-Acyl structures of $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -linked perosamine homopolymers constituting O-specific polysaccharide chain of LPS isolated from O1 *V. cholerae*, Marine vibrio bio-serogroup 1875, non-O1 *V. cholerae* serogroup Hakata, *Yersinia enterocolitica* O9 and *Brucella abortus*

高い抗菌・抗毒素抗体を与えることを報告した。このことは、副作用のない真に有効なコレラワクチン、言い換えればコンポーネントワクチンの開発の可能性を示唆するものであった。しかし、この新型コレラワクチンの開発には、O1コレラ菌O抗原を構成する3つの抗原因子を発現する化学的本体を明らかとすることが絶対に必須の条件である。

近年、O1コレラ菌と共通抗原性を持つ海水ビブリオ 1875 Original (1875 Original) とそのイナバ型変異株である海水ビブリオ 1875 Variant (1875 Variant)、*V. fluvialis* 181-86 Kobe (Kobe) および Non-O1コレラ菌 serogroup Hakata (Hakata) があいついで分離された。Shimada ら [17, 28, 19] は、これら菌株の抗原構造を菌体凝集反応および凝集素吸収試験によって検討し、Fig. 1 に示した様に、1875 Original は、B·(c)·D·E、1875 Variant および Kobe は共に C·D·E、Hakata は C·D·F·G であることを報告した。興味あることは、これら O1 コレラ菌と共通抗原性を示すビブリオの全てが共通抗原因子として C 因子を持っていることである。Haishimura [20] および Kondo ら [21] は、Hakata および 1875 Original と 1875 Variant から抽出・精製した LPS の O 抗原特異多糖側鎖部の構造解析を行ない、Hakata LPS の O 抗原特異多糖側鎖部は *N*-acetylperosamine の、また 1875 Original および 1875 Variant LPS のそれは共に *N*-3-hydroxypropionylperosamine の α (1→2) 結合 homopolymer で構成されていることを見いだした (Fig. 3)。一方、従来イナバと血清学的交叉反応原性を示すことが知られている *Brucella abortus* [22, 23] および *Yersinia enterocolitica* O9 (O9) [24] LPS の O 抗原特異多糖側鎖部の構造もまた共に O1 コレラ菌のそれと非常に類似した *N*-formylperosamine の α (1→2) 結合の homopolymer であることが Caroff ら [25, 26] によって報告された。これらの報告から、O1 コレラ菌、Hakata、1875 および O9 の共通抗原因子であるイナバ抗原因子 C の発現には、これら LPS の O 抗原特異多糖側鎖部の構造類似性が関与し、またこれら菌株の O 抗原特異性には perosamine homopolymer の *N*-acyl 基の種類が関係していることが推測された。Haishimura [27] は、イナバ LPS の O 抗原特異性および血清学的交叉反応原性は、LPS を *N*-deacyl 化することによって消失し、さらにこれを *N*-acetyl 化することによって一部回復することを見だし、イナバと Hakata との共通抗原因子、すなわち C 因子は、これら菌株 LPS の O 抗原特異多糖側鎖を構成する

perosamine homopolymerの perosamine がその種類を問わず N-acyl 化されていれば発現するという仮説を立てた。

一方、従来 B. abortus および Y. enterocolitica O 9 に対して、交叉反応原性を示すことが報告されている [28, 29, 30] 血清型 O 30 群 Salmonella (O 30₁ と O 30_{1,30₂} の 2 つの亜血清群が存在する) および本邦において集団食中毒原因菌として注目されている腸管出血性大腸菌 Escherichia coli O 157 の LPS O 抗原特異多糖側鎖部が、N-acetylperosamine、fucose、glucose および N-acetyl-galactosamine からなる repeating unit で構成されていることが報告された [31, 32, 33]。即ち、これら菌株 LPS もまた、N-acyl 化された perosamine が immunodominant として重要な役割を演じていることが予想される。従って、これら菌株と O 1 コレラ菌との O 抗原関係に興味を持たれる。

本研究では、O 1 コレラ菌の O 抗原を構成する 3 つの O 抗原因子のそれぞれの抗原特異性を発現する LPS 分子上の化学構造の解明を目的として、以下の研究を行なった。

(1) 従来報告されていない Hakata と O 9 との血清学的交叉反応原性を菌体と LPS の両レベルで検討し、イナバを含む 3 菌株の O 抗原関係を明らかにした。

(2) イナバ抗原因子 C に関する前述の仮説を立証する目的で、イナバおよび O 9 LPS の O 抗原特異多糖側鎖を構成する perosamine homopolymer の N-acyl 基、すなわちそれぞれ 3-deoxy-L-glycero-tetronyl および formyl 基を acetyl 基に、また、現在同 homopolymer の N-acyl 基として報告されていない propionyl と butyryl 基にそれぞれ変換した人工 LPS 抗原を調製し、その化学的性状を検討した上で、化学修飾によって生じる抗原性の変化を LPS レベルで追究した。

(3) 上記 (2) で調製した人工 LPS 抗原を用いて、O 1 コレラ菌のグループ抗原因子 A を決定する LPS 分子上の化学構造の解明を試みた。

(4) O 30 群 Salmonella および E. coli O 157 と O 1 コレラ菌および Hakata との O 抗原関係を菌体と LPS の両レベルで明らかにし、これら菌株 LPS の化学構造と O 1 コレラ菌の O 抗原構造、特にイナバ因子 C との関係を追究した。

(5) オガワ特異抗原因子 B の化学的実体を解明する目的で、オガワおよび 1875 Original LPS の、イナバおよび 1875 Variant LPS には存在しない特異構造の解明を試みた。

(注) 本論文で使用した略号を以下に示す。

1. 菌株の略号

O 1 コレラ菌 :	O 1 グループ・コレラ菌 (O1 <u>Vibrio cholerae</u>)
イナバ :	イナバ型 O 1 コレラ菌 (O1 <u>V. cholerae</u> Inaba)
オガワ :	オガワ型 O 1 コレラ菌 (O1 <u>V. cholerae</u> Ogawa)
Hakata :	Non-O 1 コレラ菌 serogroup Hakata (Non-O1 <u>V. cholerae</u> serogroup Hakata)
O 9 :	<u>Yersinia enterocolitica</u> O 9
O 157 :	<u>Escherichia coli</u> O 157
1875 Original :	海水ビブリオ 1875 Original (Marine vibrio bio-serogroup 1875 Original)
Soerenga :	Salmonella soerenga (O 30 ₁)
Urbana :	Salmonella urbana (O 30 ₁ 30 ₂)
1875 Variant :	海水ビブリオ 1875 Variant (Marine vibrio bio-serogroup 1875 Variant)

2. 糖質の略号

Fru :	fructose
Glc :	glucose
GlcN :	glucosamine
<u>D</u> - <u>D</u> Hep :	<u>D</u> - <u>glycero</u> - <u>D</u> - <u>manno</u> -heptose
<u>L</u> - <u>D</u> -Hep :	<u>L</u> - <u>glycero</u> - <u>D</u> - <u>manno</u> -heptose
KDO :	2-keto-3-deoxyoctonic acid
2MePerN :	2- <u>0</u> -methylperosmaine
2MePerNTet :	3-deoxy- <u>L</u> - <u>glycero</u> -tetronyl-2- <u>0</u> -methylperosmaine
2MePerNOHP :	3-hydroxypropionyl-2- <u>0</u> -methylperosamine
PerN :	perosamine (4-amino-4,6-dideoxy- <u>D</u> -mannose)

PerNAc :	<u>N</u> -acetylperosamine
PerNBut :	<u>N</u> -butyrylperosamine
PerNFor :	<u>N</u> -formylperosamine
PerNOHP :	<u>N</u> -3-hydroxypropionylperosamine
PerNPro :	<u>N</u> -propionylperosamine
PerNTet :	<u>N</u> -3-deoxy- <u>L</u> - <u>glycero</u> -tetronylperosamine
QuiN :	quinovosamine (2-amino-2,6-dideoxy- <u>D</u> -glucose)

3. その他の略号

Ac :	acetyl
But :	butyryl
CD ₃ I :	重水素ラベルされたヨウ化メチル
dAcyl :	deacyl
3dTetronyl :	3-deoxy- <u>L</u> - <u>glycero</u> -tetronyl [<u>S</u> -2,4-dihydroxybutyryl]
GC/MS :	ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー
GLC :	ガスクロマトグラフィー
EI-MS :	Electron impact-mass spectrometry
LPS :	リポ多糖 (Lipopolysaccharide)
NMR :	核磁気共鳴
PH :	受身溶血 (passive hemolysis)
PHI :	受身溶血阻止 (passive hemolysis inhibition)
Pro :	propionyl
PS :	LPS 多糖部
SRBC :	ヒツジ赤血球 (Sheep red blood cell)

第1章 O1コレラ菌のグループ抗原因子Aとイナバ抗原因子Cの解析

O1コレラ菌のO抗原構造は、長年にわたってわが国の細菌学者を中心に研究されてきた[34,35]。中でも、Sakazakiら[3,4]によって確立されたO1コレラ菌のO抗原構造に関するABC conceptは、現在最も広く支持されている。一方、O1コレラ菌のO抗原構造を決定するO抗原リポ多糖(LPS)のO抗原特異多糖側鎖が、Kenneら[10]によって、N-3-deoxy-L-glycero-tetronyl(3dTetronyl)化された perosamine(PerN)の α (1→2)結合の homopolymerで構成されていることが報告されて以来すでに十数年が経過している。しかし、そのO抗原を構成する各因子を決定するLPS分子上の化学構造は未だ解明されていない。

Y. enterocolitica O9(O9)および本邦において分離された海水ビブリオ1875 Variant(1875 Variant)と V. cholerae serogroup Hakata(Hakata)は、O1コレラ菌のO抗原因子であるC因子を持つことによってイナバ型O1コレラ菌(イナバ)との間に血清学的交叉反応性を示すことが知られている[17,19,24]。興味あることに、これら菌株LPSのO抗原特異多糖側鎖部は、O1コレラ菌のそれと非常に類似した、それぞれN-formyl、N-3-hydroxypropionylおよびN-acetyl化されたPerNの α (1→2)結合の homopolymerで構成されている。Haishimaら[27]は、C因子をそのO抗原構造の一部に持つ菌株のLPS間の構造類似性に着目し、それらのO抗原構造とPerNのN-acyl基との関係を検討した。その結果、O1コレラ菌LPSをアルカリ処理することによって調製したN-deacyl化LPSでは、Hakataとの交叉反応性すなわちイナバ因子Cの発現が認められないばかりでなく、その抗原性までも完全に消失すること、さらにそのN-deacyl化LPSをN-acetyl化することによってHakataLPSとの交叉反応性すなわちC因子活性を回復することを見出した。これらの事実から、「O1コレラ菌のイナバ因子Cは、これらLPSのO抗原特異多糖側鎖を構成する α (1→2)結合のPerN homopolymerのPerNが、その種類を問わずN-acyl化されていれば発現する」という仮説を立てた。

本章では、O1コレラ菌O抗原のイナバ因子Cを発現するLPS分子上の化学構造を解明する目的で、まず、イナバ、HakataおよびO9の3菌株のうち現在そのO抗原関係が明らかとされていないHakataとO9との間のO抗原関係を菌体レ

ベルと LPS レベルの両方で検討した。次いで、前述の仮説を立証する目的でイナバおよび O9 LPS の O 抗原特異多糖側鎖部を構成する α (1→2) 結合 PerN homopolymer の N-acyl 基を Hakata LPS と同一の acetyl (Ac) 基に、さらに現在その N-acyl 基として報告されていない propionyl (Pro) および butyryl (But) 基に変換した化学修飾人工 LPS 抗原を調製し、その化学的性状を検討するとともに化学修飾に伴う両 LPS の抗原性の変化を追究した。また、A 因子に対する特異吸収血清である A 因子血清を用い、これら未修飾 (Intact) および人工 LPS 抗原の A 因子血清に対する抗原性を検討することにより、O1 コレラ菌のグループ抗原因子 A を発現する化学的本体の解明を試みた。さらに、O1 コレラ菌の O 抗原構造を解析する新しい手段として、その O 抗原特異多糖側鎖部を構成する heterooligosaccharide の repeating unit に 2 位置換体の N-acetylperosamine 残基を持つ O30 群 Salmonella および腸管出血性大腸菌 O157 とイナバおよび Hakata との O 抗原関係を菌体と LPS の両レベルで検討した。

第1節 Non-O1 コレラ菌 Hakata と *Y. enterocolitica* O9 との血清学的交叉反応性

Hakata と O9 との O 抗原関係を凝集反応と凝集素吸収試験によって検討した結果を Table 1 に示した。数値は、各抗血清の凝集反応を示す最大希釈倍数で示した。抗 Hakata 血清は Hakata に対して、また抗 O9 血清は O9 に対してともに 1280 倍の高い凝集価を示した。さらに、抗 Hakata 血清は O9 に対して 80 倍の、抗 O9 血清は Hakata に対して 160 倍の凝集価を示し、両菌株の間には明瞭な交叉反応性が認められた。一方、凝集素吸収試験において、抗 Hakata 血清を O9 で吸収してもその Hakata に対する凝集価は低下しないが、抗 O9 血清を Hakata によって吸収すると O9 に対する凝集価は 320 倍に低下した。すなわち、抗 O9 血清は、Hakata によって一部吸収されることが示され、両菌株の O 抗原構造の類似性ととともに O9 と Hakata との共通抗原の存在が示された。O9 はイナバ型 O1 コレラ菌と Hakata の両菌株に対して交叉反応性を示すことから、O9 と Hakata の両菌株は C 因子を含む共通抗原と更にそれぞれに特異的な特異抗原因子を兼ね備えていることが明らかとなった。

Table 1 Cross agglutinin absorption tests of antisera against non-O1 *V. cholerae* serogroup Hakata and *Y. enterocolitica* O9

-, No agglutination at a dilution of 1 : 10 or higher. Antiserum against non-O1 *V. cholerae* serogroup Hakata was absorbed with *V. cholerae* CA385 cells as an R-antigen. Antigens were heated at 100°C for 1 hr.

Antiserum	Antigen	
	<i>V.cholerae</i> Hakata	<i>Y.enterocolitica</i> O9
Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup Hakata	1280	80
absorbed with <i>Y. enterocolitica</i> O9	1280	-
<i>Y. enterocolitica</i> O9	160	1280
absorbed with <i>V. cholerae</i> Hakata	-	320

Table 2 Passive hemolysis tests of antisera to non-O1 *V. cholerae* serogroup Hakata and *Y. enterocolitica* O9 against SRBC coated with their LPS

The values are expressed as 50% hemolytic titers of antisera.

Antiserum against non-O1 *V. cholerae* serogroup Hakata was absorbed with *V. cholerae* CA385 cells as an R-antigen.

Antigen (LPS)	Antiserum	
	Anti-Hakata	Anti-O9
Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup Hakata	83,000	15,000
<i>Y. enterocolitica</i> O9	3,000	14,000

両菌株の間のO抗原関係を、これらの菌株から調製したLPSをヒツジ赤血球 (SRBC) の感作抗原として用いる受身溶血 (PH) 反応によってLPSレベルで検討した。Table 2 に、抗Hakata血清と抗O9血清のHakataおよびO9LPS感作SRBCに対するPH反応の結果を各抗血清の50%溶血価で示した。抗Hakata血清はHakataLPS感作SRBCに対して、また抗O9血清はO9LPS感作SRBCに対してそれぞれ83,000倍および14,000倍の高い50%溶血価を示した。また、抗Hakata血清はO9LPS感作SRBCに対して3,000倍の、抗O9血清はHakata

LPS 感作 SRBC に対して 15,000 倍の50 %溶血価を示し、LPS のレベルにおいても両菌株の間には明瞭な血清学的交叉反応性が認められた。すなわち、菌体レベルと LPSレベルの両方において、HakataとO9とは、a,b-a,c のO抗原関係にあることが示された。従って、イナバを含む3菌株間のO抗原関係が菌体とLPSの両レベルで明らかにされた。

第2節 人工 LPS抗原の調製とその化学的性状

O1コレラ菌O抗原のイナバ因子Cを決定するLPS分子上の化学構造を明らかにする目的で、イナバおよびO9LPSの化学修飾を行なった。LPSの化学修飾としては、Fig. 4に示した様に、C因子の発現に関与することが示唆されているPerN homopolymerのN-acyl基のN-deacyl (N-dAcy1)化とN-dAcy1化LPSの種々の短鎖脂肪酸による再N-acyl化を行なった。しかし、このようなLPSの化学修飾はPerN homopolymerのN-acyl基以外にも糖鎖構造に変化を及ぼし、その結果、LPSのエピトープ構造をも著しく変化させ、それを用いる血清学的解析に支障をきたすことも予想される。そこで、この化学修飾により、PerN homopolymerのN-acyl基のみに変換が起こっていることを確認する目的で、LPSとともにLPSを弱酸処理することによって調製したLPS多糖部(PS)を同様に処理して得た化学修飾PSを用いてそれらの化学的性状を詳細に検討した。

2-1 人工抗原 LPSの調製

Fig. 4に示した様に、イナバおよびO9LPSをCaroffら[26]の方法に従って100℃、2時間アルカリ処理してN-dAcy1化LPSを調製し、ついで得られたN-dAcy1化LPSをN-Ac化[36]およびN-hydroxysuccinimideを用いた活性化エステル法[37]によってN-ProおよびN-But化して8種の人工LPS抗原を調製した。イナバおよびO9LPSをN-dAcy1化することによってそれぞれ、53~60%の収率でN-dAcy1化LPSを得た。得られたイナバN-dAcy1化LPSをN-Ac、N-ProおよびN-But化することによってそれぞれ、110、110および101%の収率でイナバN-Ac、N-ProおよびN-But化LPSが得られた。また、O9N-dAcy1LPSにおいて

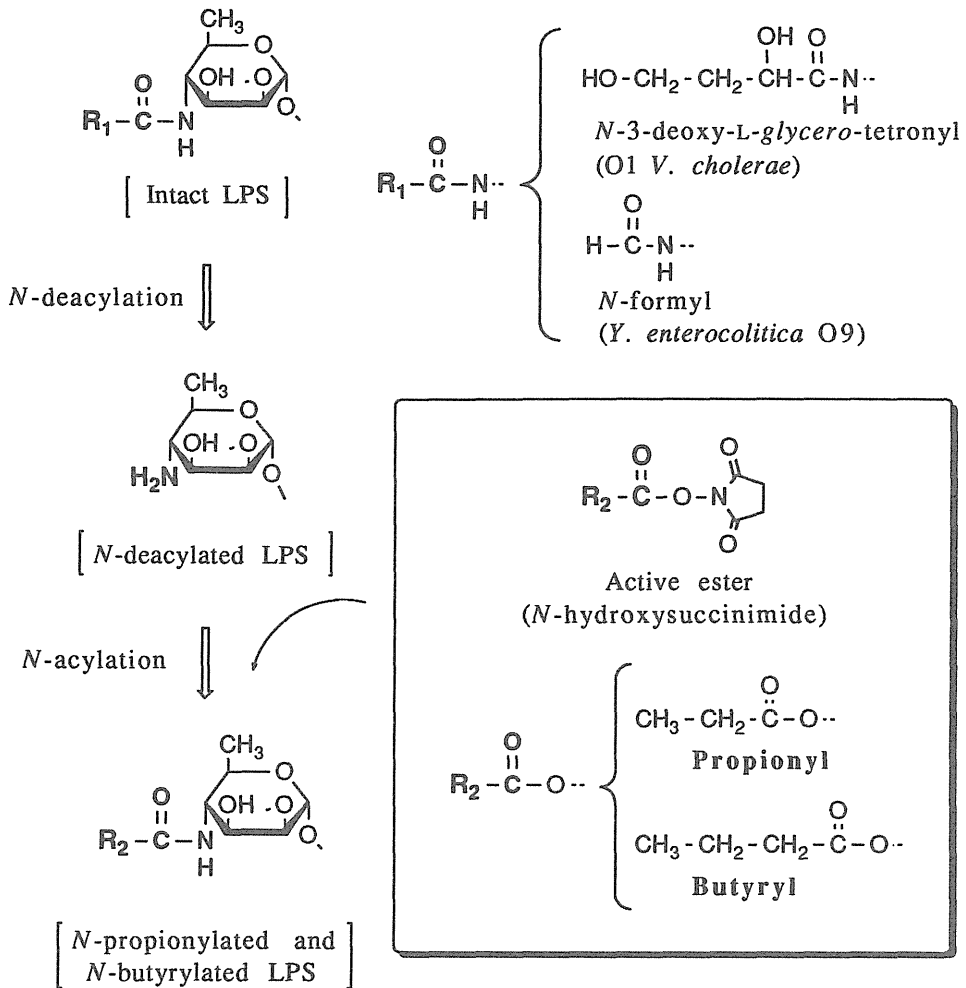


Fig. 4 Procedures of *N*-propionylation and *N*-butyrylation of *N*-deacylated O1 *V. cholerae* Inaba and *Y. enterocolitica* O9 LPS

もそれぞれ、118、106、116%の収率でO9 N-Ac、N-Pro および N-But化 LPS が得られた。

2-2 化学修飾に伴う LPSの糖組成の変化

Table 3 にイナバとO9の Intact および化学修飾 LPSの糖組成を heptoseを

3.0 モルとした相対モル比で示した。イナバ Intact LPS は glucose (Glc)、fructose (Fru)、L-glycero-D-manno-heptose (L-D Hep)、glucosamine (GlcN)、quinovosamine (QuiN) および N-3-deoxy-L-glycero-tetronylperosamine (PerNTet) から構成され、また O9 Intact LPS は Glc、D-glycero-D-manno-heptose (D-D Hep)、L-D Hep、2-keto-3-deoxyoctonic acid (KDO)、GlcN および N-formyl-perosamine (PerNFor) から構成されていた。両 LPS から調製した各種の化学修飾 LPS では、LPS の PerN homopolymer 以外の部分の糖組成には Intact LPS のそれと比べ変化は認められなかった。一方、両 LPS の PerN homopolymer を構成する PerN は化学修飾の種類に応じて、それぞれ N-acetylperosamine (PerNAc)、N-propionylperosamine (PerNPro) および N-butyrylperosamine (PerNBut) として検出された。それぞれの化学修飾 LPS には未反応によると思われる PerNTet (イナバ) および PerNFor (O9) が検出されたが、それらの含量は化学修飾を受けた PerN の含量に比べて多くとも 5.4 % 以下であり、両 LPS の PerN homopolymer を構成する PerN の N-acyl 基の 94.6 % 以上が Ac、Pro および But 基に変換されていることが示された。

2-3 化学修飾に伴う PS の分子構造の変化

イナバおよび O9 LPS の化学修飾に伴う分子構造の変化、特にその O 抗原特異多糖側鎖を構成するそれぞれ PerNTet および PerNFor の α (1 \rightarrow 2) 結合 homopolymer の分子構造の変化を検討するため、LPS から弱酸加水分解によって調製した PS を同様に処理して得た化学修飾 PS についてメチル化分析と核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの解析を行なった。

イナバ PS のメチル化分析において、2 位に置換基を持つ PerNTet に由来する 1,2,5-tri-O-acetyl-4,6-dideoxy-4- [N-methyl-(2'4'-di-O-methyl-3-deoxy)-tetronamido]-3-O-methylmannitol (A) と非還元末端の PerNTet に由来する 1,5-di-O-acetyl-4,6-dideoxy-4- [N-methyl-(2'4'-di-O-methyl-3-deoxy)-tetronamido]-2,3-di-O-methylmannitol (B) がそれぞれ検出された。両誘導体の Electron impact-mass spectrometry (EI-MS) の結果を Fig. 5 に示した。(A) からは本誘導体の特徴的なフラグメントとして m/z 103, 260, 362 にフラグメントピーク

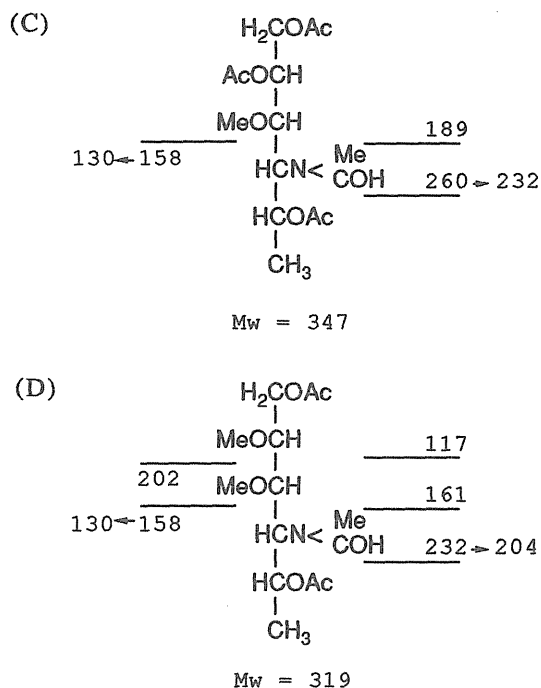
Table 3 Sugar composition of LPS isolated from O1 *V. cholerae* 569B and *Y. enterocolitica* O9 and their chemically modified LPS

The values are expressed as molar ratios relative to Hep=3.0. Glc=glucose; Fru=fructose; D-D Hep=D-glycero-D-manno-heptose; L-D Hep=L-glycero-D-manno-heptose; KDO=2-keto-3-deoxy-octonic acid; GlcN=glucosamine; QuiN=quinovosamine; PerNTet=*N*-3-deoxy-L-glycero-tetronylperosamine; PerNFor= *N*-formylperosamine; PerNAc=*N*-acetylperosamine; PerNPro=*N*-propionylperosamine; PerNBut=*N*-butyrylperosamine; nd=Not detectable by the Weissbach's periodate/2-thiobarbituric acid test under the conventional hydrolysis condition; nt=Not tested. Heptose was estimated by colorimetric method. *N*-acylperosamine was estimated after HF-solvolysis.

LPS	Glc	Fru	D-D Hep	L-D Hep	KDO	GlcN	QuiN	PerNTet	PerNFor	PerNAc	PerNPro	PerNBut
<i>O1 V. cholerae</i> 569B (Inaba)												
Intact	2.9	1.6	-	3.0	nd	2.0	0.4	9.3	-	-	-	-
<i>N</i> -Deacylated	3.0	1.4	-	3.0	nd	2.7	0.8	nt	nt	nt	nt	nt
<i>N</i> -Acetylated	2.9	1.6	-	3.0	nd	2.8	0.6	0.5	-	12.4	-	-
<i>N</i> -Propionylated	3.1	1.4	-	3.0	nd	3.0	0.6	0.5	-	-	15.9	-
<i>N</i> -Butyrylated	2.9	1.4	-	3.0	nd	2.9	0.6	0.2	-	-	-	14.0
<i>Y. enterocolitica</i> O9												
Intact	2.5	-	3.0 ^a	1.4	3.0	-	-	-	38.4	-	-	-
<i>N</i> -Deacylated	2.7	-	3.0 ^a	0.8	2.1	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt
<i>N</i> -Acetylated	2.6	-	3.0 ^a	1.5	3.0	-	-	-	1.5	31.2	-	-
<i>N</i> -Propionylated	2.5	-	3.0 ^a	1.3	3.0	-	-	-	2.1	-	38.9	-
<i>N</i> -Butyrylated	2.5	-	3.0 ^a	1.6	3.0	-	-	-	1.6	-	-	42.5

^a Total amount of L-glycero-D-manno-heptose and D-glycero-D-manno-heptose.

致していた。また、O9 PS のメチル化分析において、2 位に置換基を持つ PerNFor に由来する 1,2,5-tri-O-acetyl-4,6-di-deoxy-4-(N-methyl-formamido)-3-O-methylmannitol (C) と非還元末端の PerNFor に由来する 1,5-di-O-acetyl-4,6-dideoxy-4-(N-methyl-formamido)-2,3-di-O-methylmannitol (D) が検出され、その EI-MS (Fig.6) では (C) に特徴的なフラグメントとして m/z 158, 260 にフラグメントイオンピークが検出され、さらにそれらの 2 次フラグメント

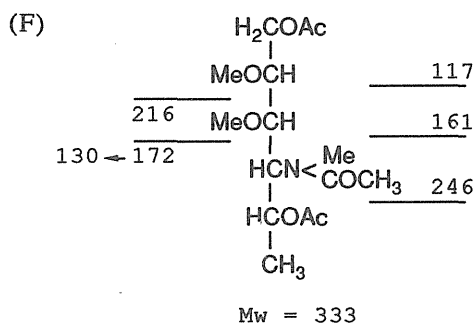
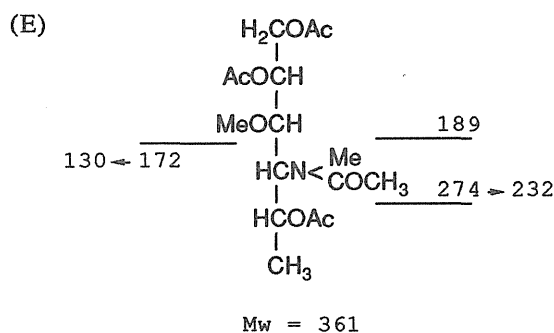


Compound Fragment ion, m/z (intensity, %)

C	88(67.2), 112(38.9), 116(67.5), 129(72.9), 130(43.1), 158(100.0), 172(4.9), 189(39.2), 200(5.5), 202(3.4), 232(2.3), 260(4.4).
D	88(50.6), 98(7.6), 101(90.2), 116(61.7), 117(100.0), 130(33.9), 142(21.7), 158(34.1), 161(36.0), 200(4.1), 204(3.3), 232(4.4).

Fig. 6 EI-mass data of 1,2,5-tri-O-acetyl-4,6-dideoxy-4-(N-methyl-formamido)-3-O-methylmannitol (C) and 1,5-di-O-acetyl-4,6-dideoxy-4-(N-methyl-formamido)-2,3-di-O-methylmannitol (D)

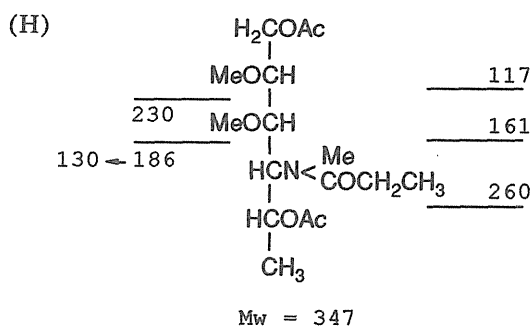
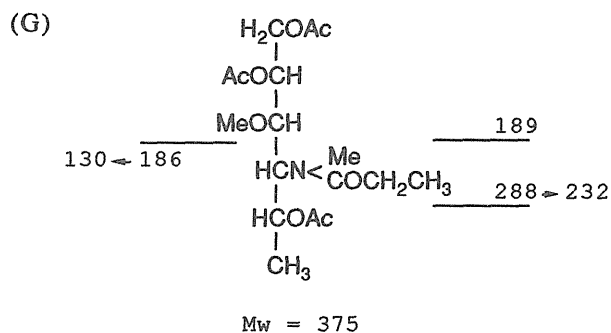
イオンが m/z 130, 232 に検出された。また、(D) からは本誘導体に特徴的なフラグメントイオンとして m/z 117, 158, 232 にフラグメントイオンピークが検出され、さらにそれらの 2 次フラグメントイオンが m/z 130, 204 に検出された。この結果は、Caroffら [26] の報告とよく一致していた。一方、化学修飾 PS のメチル化分析において、イナバおよび O 9 の N-Ac、N-Pro、N-But 化 PS からはそれぞれ



Compound	Fragment ion, m/z (intensity, %)
E	88(34.7), 112(79.1), 130(100.0), 156(8.0), 172(76.8) 189(7.7), 214(3.0), 232(8.7), 274(6.8), 301(2.3).
F	88(40.8), 101(23.2), 112(34.2), 117(58.4), 130(100.0), 156(15.1), 161(11.3), 172(71.4), 216(9.7), 246(6.6).

Fig. 7 EI-mass data of 1,2,5-tri-*O*-acetyl-4,6-dideoxy-4-(*N*-methyl-acetamido)-3-*O*-methylmannitol (E) and 1,5-di-*O*-acetyl-4,6-dideoxy-4-(*N*-methyl-acetamido)-2,3-di-*O*-methylmannitol (F)

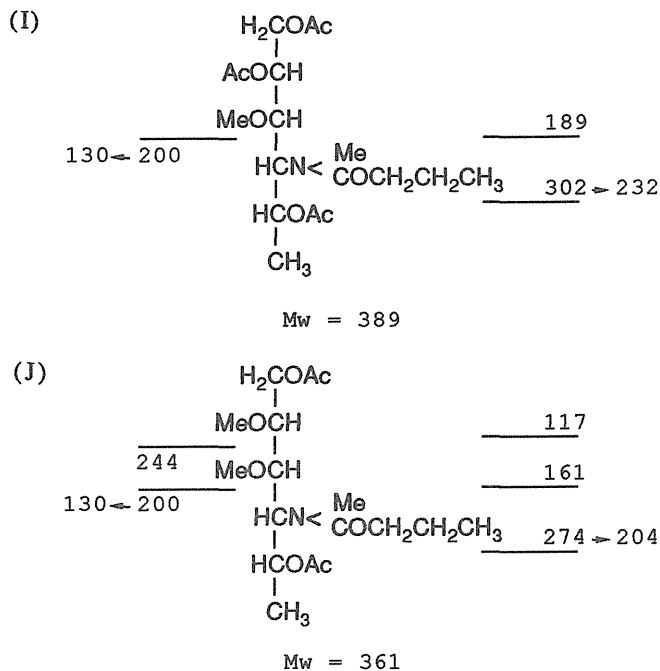
れの N-acyl 基を持った 2 位置換体と非還元末端の PerN に由来する誘導体がそれぞれ検出された。これら誘導体の EI-MS の結果を Fig.7~9 に示した。いずれの誘導体の EI-MSにおいても N-Ac 基 (E,F)、N-Pro 基 (G,H) および N-But基 (I,J) を持った 2 位置換体および非還元末端のPerN に由来する各誘導体に特徴的なフラグメントイオンおよびそれらから生じる 2 次フラグメントイオンが高感



Compound Fragment ion, m/z (intensity, %)

G	88(34.1),112(38.9),126(7.5),129(16.5),130(100.0),144(19.0), 172(10.6),189(8.1),230(2.1),232(14.0),288(10.0).
H	88(40.0),117(100.0),130(91.7),144(18.0),161(12.2), 170(16.1),186(74.7),200(3.2),230(11.0),260(15.1).

Fig. 8 EI-mass data of 1,2,5-tri-*O*-acetyl-4,6-dideoxy-4-(*N*-methyl-propionamido)-3-*O*-methylmannitol (G) and 1,5-di-*O*-acetyl-4,6-dideoxy-4-(*N*-methyl-propionamido)-2,3-di-*O*-methylmannitol (H)



Compound	Fragment ion, m/z (intensity, %)
G	88(24.4), 129(13.1), 130(100.0), 158(9.5), 172(10.4), 189(8.3), 200(96.0), 232(20.2), 244(2.1), 302(9.3).
H	88(31.8), 101(18.1), 117(68.5), 130(100.0), 161(12.5), 184(11.4), 200(78.1), 204(3.6), 244(9.6), 274(7.4).

Fig. 9 EI-mass data of 1,2,5-tri-*O*-acetyl-4,6-dideoxy-4-(*N*-methylbutanamido)-3-*O*-methylmannitol (I) and 1,5-di-*O*-acetyl-4,6-dideoxy-4-(*N*-methylbutanamido)-2,3-di-*O*-methylmannitol (J)

度で検出された。Chemical ionization-mass spectrometry (CI-MS) によって測定した (A)~(J) の分子量は、Fig. 5~9 に示した理論値と一致していた。以上の誘導体の他に、イナバおよび O 9 の化学修飾 PS から、化学修飾を受けなかった PerN に由来するそれぞれ (A) および (C) が少量検出されたが、それら以外の PerN 誘導体は検出されなかった。

イナバおよび O 9 の Intact PS と化学修飾 PS の ¹³C-NMR の結果を Table 4 に

Table 4 ^{13}C -NMR data of intact and chemically modified PS prepared from O1 *V. cholerae* 569B and *Y. enterocolitica* O9 LPS

The values are expressed as chemical shifts (ppm) relative to that of internal acetone ($-\text{CH}_3$, 30.09 ppm). Coupling constants ($J_{\text{C1-H1}}$, Hz) were given in parentheses.

PS	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'
<i>O1 V. cholerae</i> 569B (Inaba)										
Intact	101.88(176.0)	78.23	69.28	53.88	68.48	17.66	178.86	69.96	36.87	58.80
<i>N</i> -Deacylated	102.38(174.6)	78.24	70.61	54.77	70.57	17.78				
<i>N</i> -Acetylated	101.34(174.1)	77.88	69.33	53.91	68.67	17.63	175.56	22.98		
<i>N</i> -Propionylated	101.75(175.0)	78.15	69.57	53.84	68.80	17.64	180.17	30.35	10.46	
<i>N</i> -Butyrylated	101.76(176.8)	78.16	69.51	53.87	68.02	17.75	179.73	38.93	19.91	13.68
<i>Y. enterocolitica</i> O9										
Intact	101.69(172.2)	78.06	69.29	52.81	68.58	17.70	166.30			
<i>N</i> -Deacylated	102.06(174.20)	77.94	68.88	54.84	68.83	17.71				
<i>N</i> -Acetylated	101.64(174.5)	78.07	69.55	54.03	69.12	17.64	176.16	23.02		
<i>N</i> -Propionylated	101.73(176.4)	78.14	69.53	53.82	68.80	17.63	180.17	30.35	10.45	
<i>N</i> -Butyrylated	101.76(176.6)	78.14	69.53	53.89	68.84	17.76	179.23	30.95	19.92	13.68

示した。イナバ Intact PSからは、101.88, 78.23, 69.28, 53.88, 68.48および 17.66 ppm にPerN homopolymerの PerN backboneに由来する 6 本のシグナルが検出され、さらに 178.86, 69.96, 36.87 および 58.80 ppmにその N-acyl 基である 3dTetronyl基に由来するの 4 本のシグナルが検出された。この結果は、Kenneら [10]の報告と一致していた。一方、イナバ N-dAcyl化 PS からは、3dTetronyl 基に由来するシグナルは検出されず、PerN backbone に由来する 6 本の強いシグナルのみが検出された。また、イナバ N-acyl 化 PS からは、PerN backbone に由来する 6 本のシグナルの他に、PerN の N-acyl 基に由来する 175.56, 22.98 ppm (N-Ac)、180.17, 30.35, 10.46 ppm (N-Pro)および 179.73, 38.93, 19.91, 13.68 ppm (N-But) のシグナルが検出された。これら 4 種類の化学修飾 PS から検出されたPerNbackboneに由来するシグナルの化学シフト値は、Intact PS のそれとほぼ一値していた。イナバの Intact および化学修飾 PS のアノマー C-H カップリング定数は、174.1 ~ 176.8 Hz を示し、これら PS の PerN は α - 配位であることが示された [38, 39] 。イナバ PS の $^1\text{H-NMR}$ において、PerN のアノマープロトン (4.98 ppm)、リングプロトン (3.89 ~ 3.61 ppm) および 6 位のメチルプロトン (1.15 ppm)に加えて、3dTetronyl基に由来するシグナルが検出された。また、イナバの化学修飾 PS からは、Intact PS と類似した PerN に由来するシグナルに加え、対応した N-acyl 基のメチルおよびメチレンプロトンに由来するシグナルが得られた。O9 PSの $^{13}\text{C-NMR}$ では、PerN homopolymerの PerN backbone に由来する 6 本の強いシグナルと PerN の N-acyl 基である formyl 基に由来するシグナル (166.30 ppm) が検出され、Caroffら [26]の報告と一致する結果が得られた。また、O9 の化学修飾 PS の $^{13}\text{C-NMR}$ の結果は、イナバの化学修飾 PS について得られた結果と良く一致していた。また、O9 PSを構成する PerNのアノマー炭素は、 α 配位を示し、 $^1\text{H-NMR}$ の結果はイナバのそれと同様であった。これらの結果は、LPS の化学修飾によってイナバおよびO9 LPS の PerN homopolymer 自体は影響を受けずに、その N-acyl 基のみが変換されていることを示すものであった。

以上の結果から、イナバおよびO9 LPS を化学修飾することによって、その糖鎖構造に影響を与えることなく、イナバおよびO9 LPS のO抗原特異多糖側鎖を構成する α (1 \rightarrow 2)結合の PerN homopolymer の N-acyl 基である 3dTetronyl と

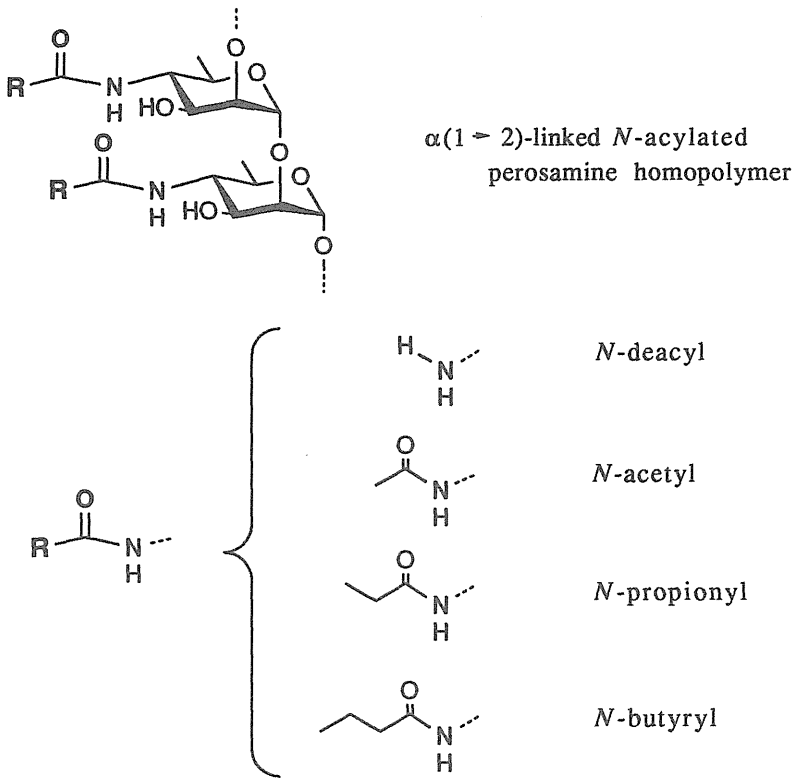


Fig. 10 *N*-Acyl structures of $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -linked perosamine homopolymers constituting O-specific polysaccharide chain of chemically modified LPS (artificial LPS antigen) prepared from O1 *V. cholerae* Inaba and *Y. enterocolitica* O9 LPS

formyl基が、Ac、Pro および But基に変換されたことが示れた (Fig.10)。すなわち、LPS のO抗原特異多糖側鎖部を構成する $\alpha(1 \rightarrow 2)$ 結合 PerN homopolymer の *N*-acyl基を Hakata LPS のそれと同一の Ac 基に、また現在同 homopolymerの *N*-acyl基として報告されていない Proおよび But 基に変換した、全く新しい人工 LPS 抗原を得ることができた。

第3節 人工 LPS抗原の血清学的性状

前述の様にイナバおよびO9 LPS に種々の化学修飾を施して調製した人工 LPS 抗原の抗原性の変化を追究する目的で、これら LPSを SRBC の感作抗原として用

いた受身溶血 (PH) 反応と受身溶血阻止 (PHI) 試験によって検討した。

3-1 人工 LPS抗原に対する全菌抗血清の受身溶血反応

Table 5 にイナバ、O 9、Hakata および 1875 Variant の Intact LPS とイナバおよびO 9の各種人工 LPS抗原で感作した SRBC に対する抗イナバ血清、抗 O 9 血清、抗 Hakata 血清および抗 1875 Variant 血清の PH 反応の結果を示した。数値は、各抗血清の 50 % 溶血価で示し、数値が高いほど抗血清に対する感作抗原 LPS の抗原性が高いことを示している。

イナバの Intact LPS および人工 LPS抗原で感作した SRBC に対する抗イナバ血清の Homologous な溶血系において、抗イナバ血清はイナバ Intact LPS 感作 SRBCに対して 7,500倍の 50 % 溶血価を示したが、イナバ LPSを N-dAcyl化するることによってその抗原性は完全に消失した。しかし、抗イナバ血清は、その N-dAcyl 化 LPSを N-acyl 化して得たイナバ N-Ac、N-Pro および N-But化 LPS 感作 SRBC に対してそれぞれ 5,600倍、8,400 倍および 6,900倍の 50 % 溶血価を示した。また、O 9の Intact LPS および人工 LPS抗原で感作した SRBC に対する抗O 9血清の Homologous な溶血系においてもイナバ同様に、抗O 9血清は O9 Intact LPS感作 SRBC に対して 14,000 倍の 50 % 溶血価を示したが、O9 LPS を N-dAcyl化することによってその抗原性は完全に消失した。しかし、O9 の N-Ac、N-Pro および N-But化 LPS感作 SRBC に対して抗O 9血清は、それぞれ 8,700倍、2,300 倍および 3,700倍の 50 % 溶血価を示した。すなわち、イナバ及びO 9 LPS の抗原性の発現には、その LPSのO抗原特異多糖側鎖を構成する PerN homopolymerのN-acyl基が密接に関係していること、言い換えれば、N-acyl 基は PerN homopolymer の抗原決定基であることが示された。一方、イナバの Intact LPSおよび人工 LPS抗原で感作したSRBCに対する抗O 9血清、抗 Hakata 血清および抗 Variant血清の Heterologous な溶血系において、イナバ Intact LPS 感作 SRBC に対して抗O 9血清、抗 Hakata 血清および抗 Variant血清は、それぞれ 500倍、5,000 倍および 1,700倍の50 %溶血価を示したが、イナバ LPS を N-dAcyl化することによってその血清学的交叉反応原性すなわち C 因子活性は

Table 5 Passive hemolysis tests of artificial LPS antigens of O1 *V. cholerae* 569B and *Y. enterocolitica* O9 in comparison with their intact LPS

The values are expressed as 50% hemolytic titers of antisera. - = Fifty percent hemolysis was not observed at a dilution of 200 or higher. Antisera used in this experiments were absorbed with *V. cholerae* CA385 cells as an R-antigen.

Antigen (LPS)	Antiserum			
	Anti-569B	Anti-O9	Anti-Hakata	Anti-Variant
<i>O1 V. cholerae</i> 569B (Inaba)				
Intact	7,500	500	5,000	1,700
<i>N</i> -Deacylated	-	-	-	-
<i>N</i> -Acetylated	5,600	8,400	39,000	17,000
<i>N</i> -Propionylated	8,400	6,400	36,000	14,000
<i>N</i> -Butyrylated	6,900	2,300	2,400	19,000
<i>Y. enterocolitica</i> O9				
Intact	300	14,000	3,000	6,800
<i>N</i> -Deacylated	-	-	-	-
<i>N</i> -Acetylated	6,000	8,700	42,000	7,900
<i>N</i> -Propionylated	1,400	2,300	2,400	4,900
<i>N</i> -Butyrylated	2,400	3,700	2,400	4,900
Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup				
Hakata	4,900	15,000	83,000	24,000
Marine vibrio bio-serogroup 1875				
Variant	300	1,500	1,300	12,000

完全に消失した。しかし、イナバの N-Ac、N-Pro 及び N-But LPS感作 SRBC に対して、抗 O 9 血清はそれぞれ 8,400倍、6,400 倍および 2,300倍の 50 % 溶血価を、抗 Hakata 血清はそれぞれ 39,000 倍、36,000倍および 2,400倍の、また抗 Variant血清はそれぞれ 17,000 倍、14,000倍および 19,000 倍の 50 % 溶血価を示した。すなわち、イナバ LPSを N-dAcyl化することによってこれら抗血清に対する血清学的交叉反応原性を消失し、ついでその N-dAcyl化 LPSを N-acyl化することによってその血清学的交叉反応原性を一部もしくは Intact LPS 以上に回復した。また、O 9 の Intact LPS および人工 LPS抗原で感作した SRBC に対する抗イナバ血清、抗 Hakata 血清及び抗 Variant血清の Heterologous な溶血系においても同様に、O 9 Intact LPS 感作 SRBC に対して抗イナバ血清、抗 Hakata血清および抗 Variant血清はそれぞれ 300倍、3,000 倍および 6,800倍の 50 %溶血価を示したが、O 9 LPS を N-dAcyl化することによってその交叉反応性は消失した。しかし、O 9 の N-Ac、N-Pro および N-But LPS 感作 SRBC に対して、抗イナバ血清はそれぞれ 6,000倍、1,400 倍および 2,400倍の 50 % 溶血価を、抗 Hakata 血清はそれぞれ 42,000 倍、2,400 倍および 2,400倍の、また抗 Variant血清はそれぞれ 7,900倍、4,900 倍および 4,900倍の 50 % 溶血価を示した。以上の結果から、イナバおよびO 9 LPS を N-dAcyl化することによって C 因子活性を失うのみならず、その他の抗原性をも完全に消失することが示された。さらに、これら N-dAcyl化 LPSを N-Ac、N-Pro および N-But化することによって C 因子活性を回復することが示された。すなわち、イナバ因子 C は、LPS の O 抗原多糖側鎖を構成する PerN homopolymer の PerN が、その種類を問わず N-acyl化されていれば発現することが示された。

3-2 全菌抗血清を用いた受身溶血系に対する人工 LPS抗原の受身溶血阻止試験

イナバ LPS 感作 SRBC /抗イナバ血清、O 9 LPS 感作 SRBC /抗 O 9 血清、Hakata LPS感作 SRBC /抗 Hakata 血清および 1875 Variant LPS 感作 SRBC /抗 1875 Variant 血清の Homologous な溶血系に対してイナバ、O 9、Hakataおよび1875 Variantの Intact LPS とイナバおよびO 9 の人工 LPS抗原をインヒビターとして用いた PHI試験の結果を Table 6に、また LPS分子上に存在するイナ

Table 6 Passive hemolysis inhibition tests of artificial LPS antigens of O1 *V. cholerae* 569B and *Y. enterocolitica* O9 in comparison with their intact LPS against homologous passive hemolysis systems. The values are expressed as 50% inhibitory concentrations of inhibitor ($\mu\text{g/ml}$). - = Fifty percent inhibition was not observed at a concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ or lower. Antisera against *V. cholerae* were absorbed with *V. cholerae* CA385 cells as an R-antigen.

Inhibitor (LPS)	Passive hemolysis system			
	569B LPS / Anti-569B	O9 LPS / Anti-O9	Hakata LPS / Anti-Hakata	Variant LPS / Anti-Variant
<i>O1 V. cholerae</i> 569B (Inaba)				
Intact	0.04	-	-	-
<i>N</i> -Deacylated	-	-	-	-
<i>N</i> -Acetylated	-	-	-	-
<i>N</i> -Propionylated	-	-	-	7.5
<i>N</i> -Butyrylated	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> O9				
Intact	-	0.06	-	-
<i>N</i> -Deacylated	-	-	-	-
<i>N</i> -Acetylated	-	-	-	76
<i>N</i> -Propionylated	-	-	-	27
<i>N</i> -Butyrylated	-	-	-	-
Non-O1 <i>V. cholerae</i>				
serogroup Hakata	-	-	0.09	-
Marine vibrio bio-serogroup				
1875 Variant	-	-	-	0.01

バ因子Cによって溶血を生じる溶血系である Hakata LPS 感作 SRBC /抗イナバ血清とVariant LPS 感作SRBC/抗イナバ血清の Heterologous な溶血系に対して同インヒビター LPSを用いた PHI試験の結果を Table 7に示した。数値は、インヒビターの 50 % 阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$) で示し、数値が低いほどその溶血系を構成する抗原構造とインヒビターの持つ抗原構造が類似していることを示している。

Table 6 に示した様に、イナバ、O9、Hakataおよび 1875 Variant のIntact LPS は、それぞれイナバ LPS感作 SRBC /抗イナバ血清、O9 LPS 感作 SRBC /

Table 7 Passive hemolysis inhibition tests of artificial LPS antigen of O1 *V. cholerae* 569B and *Y. enterocolitica* O9 in comparison with their intact LPS against heterologous passive hemolysis systems

The values are expressed as 50% inhibitory concentrations of inhibitor ($\mu\text{g/ml}$). - = Fifty percent inhibition was not observed at a concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ or lower. Antiserum was absorbed with *V. cholerae* CA385 cells as an R-antigen.

Inhibitor (LPS)	Passive hemolysis system	
	Hakata LPS/ Anti-569B	Variant LPS / Anti-569B
<i>O1 V. cholerae</i> 569B (Inaba)		
Intact	0.04	0.35
<i>N</i> -Deacylated	-	-
<i>N</i> -Acetylated	0.05	0.09
<i>N</i> -Propionylated	0.16	0.04
<i>N</i> -Butyrylated	0.44	0.07
<i>Y. enterocolitica</i> O9		
Intact	0.35	4.4
<i>N</i> -Deacylated	-	-
<i>N</i> -Acetylated	0.54	0.76
<i>N</i> -Propionylated	0.31	0.10
<i>N</i> -Butyrylated	0.34	0.48
Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup		
Hakata	0.10	0.30
Marine vibrio bio-serogroup 1875		
Variant	0.01	0.30

抗 O 9 血清、Hakata LPS感作 SRBC /抗 Hakata 血清および 1875 Variant LPS 感作 SRBC /抗 1875 Variant 血清の Homologous な溶血系に対して高い阻止活性 (0.01~0.09 $\mu\text{g} / \text{ml}$) を示した。しかし、イナバおよび O 9 の人工 LPS 抗原は、いずれの溶血系に対しても阻止活性を示さなかった。すなわち、イナバおよび O 9 LPS の O 抗原特異多糖側鎖を構成する PerN homopolymer の N-Acyl 基の種類がその O 抗原特異性に密接に関与していることが示唆された。

一方、イナバ因子 C によって溶血を生じる Hakata LPS感作 SRBC /抗イナバ血清と 1875 Variant LPS感作 SRBC /抗イナバ血清の溶血系に対する受身溶血阻止試験において (Table 7)、イナバ抗原因子 C をその O 抗原構造の一部に持つイナバ、O 9、Hakata および 1875 Variant の Intact LPS は高い阻止活性 (0.01~4.4 $\mu\text{g} / \text{ml}$) を示したが、イナバおよび O 9 の N-dAcyl 化 LPS はその阻止活性を完全に消失した。しかし、イナバおよび O 9 の N-acyl 化 LPS すなわち N-Ac、N-Pro および N-But 化 LPS は、両溶血系に対して強い溶血阻止活性 (0.05~0.76 $\mu\text{g} / \text{ml}$) を示し、天然には存在しない全く新しい人工 LPS 抗原である N-Pro および N-But 化 LPS もまたイナバ抗原因子 C を発現することが示された。すなわち、受身溶血阻止試験においてもイナバ抗原因子 C は、これら LPS の O 抗原特異多糖側鎖を構成する PerN homopolymer の PerN がその種類を問わず N-acyl 化されていれば発現することが示され、イナバ抗原因子 C に関する前述の仮説が立証された。

3-3 人工 LPS 抗原に対する A 因子血清を用いた受身溶血反応および受身溶血阻止試験

前述の様に、O 1 コレラ菌、O 9、Hakata および 1875 LPS の O 抗原多糖側鎖を構成する PerN homopolymer の PerN の N-acyl 基はその種類によらずイナバ抗原因子 C の発現に関与するが、一方ではそれぞれの菌株の O 抗原特異性に密接に関係していることが予想された。O 抗原にイナバ因子 C を持つことによって血清学的交叉反応原性を示すこれら菌株の O 抗原構造において、O 1 コレラ菌のグループ抗原因子 A は、他の菌株の O 抗原には存在しない O 1 コレラ菌の特異抗原因子といえる。そこで、O 1 コレラ菌 LPS の O 抗原特異多糖側鎖を構成する PerN

homopolymer の PerN の *N*-acyl 基である 3dTetronyl 基と A 因子の発現との関係を明らかとする目的で、Intact LPS および人工 LPS 抗原を感作抗原として用いた O1 コレラ菌の共通抗原因子 A に対する特異血清である A 因子血清との PH 反応と、A 因子によって溶血を生じる受身溶血系に対するこれら LPS をインヒビターとして用いた PHI 試験を行なった。

Table 8 に Intact および人工抗原 LPS を感作抗原として用いた時の A 因子血清の PH 反応の結果を示した。A 因子血清は、イナバ Intact LPS 感作 SRBC に対して 6,900 倍の高い 50% 溶血価を示したが、これに反して O9、Hakata および 1875 Variant の Intact LPS 感作 SRBC に対しては溶血活性を示さず、これら菌株の菌体凝集反応によって示された O 抗原構造とよく一致する成績が得られた。

Table 8 Passive hemolysis tests of artificial LPS antigens of O1 *V. cholerae* 569B and *Y. enterocolitica* O9 in comparison with their intact LPS against anti-factor A serum

The values are expressed as 50% hemolytic titers of antisera. - = Fifty percent hemolytic titer was observed at a dilution of 200 or higher.

LPS	Anti-factor A serum
<i>O1 V. cholerae</i> 569B (Inaba)	
Intact	6,900
<i>N</i> -Deacylated	-
<i>N</i> -Acetylated	-
<i>N</i> -Propionylated	-
<i>N</i> -Butyrylated	920
<i>Y. enterocolitica</i> O9	
Intact	-
<i>N</i> -Deacylated	-
<i>N</i> -Acetylated	-
<i>N</i> -Propionylated	230
<i>N</i> -Butyrylated	1,400
Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup	
Hakata	-
Marine vibrio bio-serogroup	
1875 Variant	-

しかし、A 因子血清はイナバと O 9 の人工 LPS 抗原で感作した SRBC に対する溶血系において、イナバ *N*-But 化 LPS および O 9 の *N*-Pro および *N*-But 化 LPS で感作した SRBC に対してそれぞれ 920 倍、230 倍および 1,400 倍の 50 % 溶血価を示し、これら人工 LPS 抗原は部分的に低い A 因子活性を発現したが、すべての人工 LPS 抗原には共通して顕著な A 因子活性の発現は認められなかった。

オガワ LPS 感作 SRBC / A 因子血清とイナバ LPS 感作 SRBC / A 因子血清の溶血系に対して Intact LPS および人工 LPS 抗原をインヒビターとして用いた PHI 試験の結果を Table 9 に示した。PHI 試験においても同様に、イナバ Intact LPS

Table 9 Passive hemolysis inhibition tests of artificial LPS antigens of O1 *V. cholerae* 569B and *Y. enterocolitica* O9 in comparison with their intact LPS against passive hemolysis systems using anti-factor A serum
The values are expressed as 50% inhibitory concentrations of inhibitor ($\mu\text{g/ml}$). - = Fifty percent inhibition was not observed at a concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ or lower.

Inhibitor (LPS)	Passive hemolysis system	
	NIH 41 LPS / Anti-A	569B LPS / Anti-A
<i>O1 V. cholerae</i> 569B (Inaba)		
Intact	0.03	0.01
<i>N</i> -Deacylated	-	-
<i>N</i> -Acetylated	80	95
<i>N</i> -Propionylated	-	-
<i>N</i> -Butyrylated	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> O9		
Intact	60	60
<i>N</i> -Deacylated	-	-
<i>N</i> -Acetylated	-	-
<i>N</i> -Propionylated	-	-
<i>N</i> -Butyrylated	-	-
Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup		
Hakata	-	-
Marine vibrio bio-serogroup		
1875 Varinat	-	-

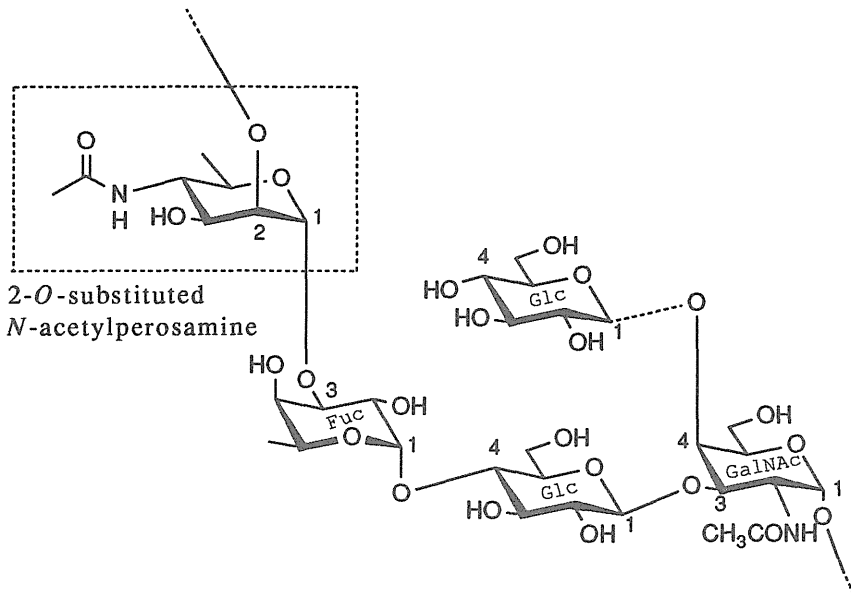
のみが両溶血系を強く阻止し (0.03および 0.01 $\mu\text{g} / \text{ml}$)、他の Intact LPS および人工 LPS抗原は阻止活性を示さなかった。すなわち、LPS のO抗原特異多糖側鎖を構成する PerN homopolymer の PerN N-Acylとして 3dTetronyl 基を持つイナバ Intact LPS のみがA因子活性を発現することが示された。

以上の結果から、O1コレラ菌O抗原のイナバ因子Cは、そのLPSO抗原特異多糖側鎖を構成する α (1 \rightarrow 2)結合のPerN homopolymer のPerNがその種類を問わず N-acyl 化されていれば発現することが示された。またさらに、O1コレラ菌の共通抗原因子Aは、同 homopolymerが 3dTetronyl 基によって N-acyl 化されていることによるのみ発現することが示された。

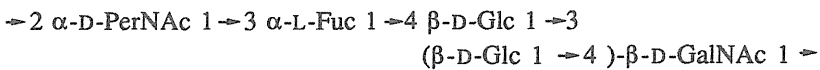
第4節 O30 群 *Salmonella* および *E. coli* O157 とイナバ型O1コレラ菌および non-O1コレラ菌 Hakata との血清学的交叉反応原性

近年、*Y. enterocolitica* O9および *Brucella abortus* と血清学的交叉反応原性を示すことが知られていた [28,29,30] O30群 *Salmonella* と腸管出血性大腸菌 *E. coli* O157(O157) LPSのO抗原特異多糖側鎖の構造が相次いで報告された。Bundleら [31] および Perryら [33] は、O30群 *Salmonella* の2つの亜血清群であるO30₁ 亜群に分類されている *Salmonella landau*とO157 LPS のO抗原特異多糖側鎖部は共に、Fig 10に示す PerNAc、Fuc、Glc、GalNAcからなる tetrasaccharideの repeatig unitの反復で構成されていることを報告した。またさらに、Perryら [32]は、O30群 *Salmonella* のもう1つの亜血清群である O30₁30₂亜群に分類されている *Salmonella urbana* (Urbana) のLPSO抗原特異多糖側鎖部の構造は、上記 tetrasaccharideの repeating unit のGalNAc 残基の4位に分岐糖として1分子のGlcを持つことを報告した。すなわち、これら菌株のLPSO抗原特異多糖側鎖には2位置換体のPerNAc構造が存在し、これら菌株とO1コレラ菌および Hakata とのO抗原関係に興味を持たれる。

そこで、そのO抗原特異多糖側鎖が α (1 \rightarrow 2)結合のPerN homopolymerで構成されている菌株のLPSを用いる解析とは異なるO1コレラ菌O抗原構造への新しいアプローチとして、Urbana、*S. soerenga*(O30₁ 亜群 *Salmonella* の代表菌株) (Soerenga) およびO157 とO1コレラ菌とのO抗原関係を、菌体凝集反応とこれ



Salmonella urbana (O30₁30₂) :



S. landau (O30₁) and *E. coli* O157 :

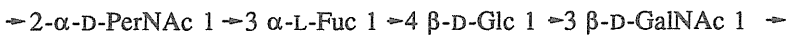


Fig. 11 Structure of repeating unit constituting the O-specific polysaccharide chain of LPS isolated from *Salmonella urbana* (O30₁30₂), *S. landau* (O30₁) and *E. coli* O157

ら LPSを感作抗原として用いた PH 反応によって菌体レベルと LPSレベルの両レベルで検討した。

4-1 菌体凝集反応

抗 Urbana 血清、抗 Soerenga 血清、抗 O157 血清、抗 Hakata 血清および抗イナバ血清の Urbana、Soerenga、O157、Hakataおよびイナバの菌体抗原に対する菌体凝集反応の結果をTable 10に示した。数値は、凝集反応を示す抗血清の最大希釈倍数で示した。抗 Urbana 血清、抗 Soerenga 血清および抗 O157 血清

Table 10 Cross-agglutination of antisera against *S. urbaba*, *S. soerenga*, *E. coli* O157, non-O1 *V. cholerae* serogroup Hakata and O1 *V. cholerae* 569B

- = No agglutination at a dilution of 1 : 10 or higher. Antigens were heated at 100°C for 1 hr. Antisera against *V. cholerae* were absorbed with *V. cholerae* CA385 cells as an R-antigen.

Antigen	Antiserum				
	Anti-Urbana	Anti-Soerenga	Anti-O157	Anti-Hakata	anti-569B
<i>S. urbana</i> (O30 ₁ 30 ₂)	1,280	640	640	80	-
<i>S. soerenga</i> (O30 ₁)	160	640	640	80	-
<i>E. coli</i> O157	320	640	1,280	80	-
Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup Hakata	40	40	1,280	1,280	20
O1 <i>V. cholerae</i> 569B (Inaba)	-	-	-	20	1,280

は、Urbana、Soerenga、O 157 に対して高い凝集価を示し、その抗原構造の類似性が示された。また、抗 Urbana 血清、抗 Soerenga 血清および O 157 血清は、Hakata に対してそれぞれ 40 倍、40 倍および 1,280 倍の凝集価を示し、両菌株間に明瞭な血清学的交叉反応原性が認められたが、イナバに対する交叉反応性は認められなかった。また、抗 Hakata 血清は Urbana、Soerenga、O 157 に対して、80 倍の凝集価を示し、明瞭な血清学的交叉反応原性が認められた。しかし、抗イナバ血清は、Hakata に対して 20 倍の凝集価を示したが、Urbana、Soerenga、O 157 に対する凝集活性は認められなかった。以上の結果から、Urbana、Soerenga、O 157 は、Hakata に対して明瞭な血清学的交叉反応原性を示すが、イナバに対するその交叉反応性は認められず、従って Urbana、Soerenga および O 157 の O 抗原には O 1 コレラ菌のイナバ因子 C が存在しないことが示された。

4-2 受身溶血反応

さらに、凝集反応において示された Urbana、Soerenga、および O 157 と Hakata およびイナバとの O 抗原関係を、これら菌株 LPS を感作抗原として用いる PH 反応によって LPS レベルで追究した。

Table 11 に、Urbana、Soerenga、O 157、Hakata およびイナバの LPS 感作 SRBC に対する抗 Urbana 血清、抗 Soerenga 血清、抗 O 157 血清、抗 Hakata 血清および抗イナバ血清の PH 反応の結果を、各抗血清の 50 % 溶血価で示した。抗 Urbana 血清、抗 Soerenga 血清および抗 O 157 血清は、それぞれ Urbana、Soerenga および O 157 LPS 感作 SRBC に対して高い 50 % 溶血価を示し、その抗原構造の類似性が示された。抗 Urbana 血清、抗 Soerenga 血清および抗 O 157 血清は、Hakata LPS に対してそれぞれ 1,700 倍、1,600 倍および 24,000 倍の高い 50 % 溶血価を示し、LPS レベルにおいてもこれら菌株と Hakata との血清学的交叉反応原性が認められたが、イナバ LPS に対する交叉反応性は認められなかった。また、抗 Hakata 血清は、Urbana、Soerenga および O 157 LPS 感作 SRBC に対してそれぞれ 1,800 倍、1,400 倍および 4,900 倍の高い 50 % 溶血価を示し、Hakata とこれら菌株間の血清学的交叉反応原性が認められた。しかし、抗イナバ血清は、Hakata LPS 感作 SRBC に対して 4,900 倍の 50 % 溶血価を示したが、

Table 11 Passive hemolysis tests of antisera to *S. urbana*, *S. soerenga*, *E. coli* O157, non-O1 *V. cholerae* serogroup Hakata and O1 *V. cholerae* 569B against SRBC coated with their LPS
 Antisera against *V. cholerae* were absorbed with *V. cholerae* CA385 cells as an R-antigen.

Antigen (LPS)	Antiserum				
	Anti-Urbana	Anti-Soerenga	Anti-O157	Anti-Hakata	Anti-569B
<i>S. urbana</i> (O30 ₁ 30 ₂)	8,400	10,000	36,000	1,800	-
<i>S. soerenga</i> (O30 ₁)	7,900	27,000	68,000	1,400	-
<i>E. coli</i> O157	10,000	22,000	7,2000	4,900	-
Non-O1 <i>V. cholerae</i> serogroup Hakata	1,700	1,600	24,000	83,000	4,900
O1 <i>V. cholerae</i> 569B (Inaba)	-	-	-	5,000	7,500

Urbana、SoerengaおよびO157 LPS に対する交叉反応原性は認められなかった。以上の結果から、LPS のレベルにおいてもUrbana、Soerenga、O157 は、Hakata に対して明瞭な血清学的交叉反応原性を示したが、イナバに対する血清学的交叉反応性は認められず、そのO抗原にO1コレラ菌のイナバ因子Cを持たないことが示された。すなわち、Urbana、SoerengaおよびO157 とHakataとの間に見いだされた血清学的交叉反応原性は、両 LPSのO抗原特異多糖側鎖部に共通して存在する PerNAc 残基の N-Ac 基によって生じることが示唆され、さらに、イナバ抗原因子Cは、その菌株 LPSのO抗原特異多糖側鎖の部分構造として存在する1分子の N-acyl 化された PerN によっては発現せず、 α (1→2) 結合の homopolymer として存在することによって発現することが示唆された。

考察

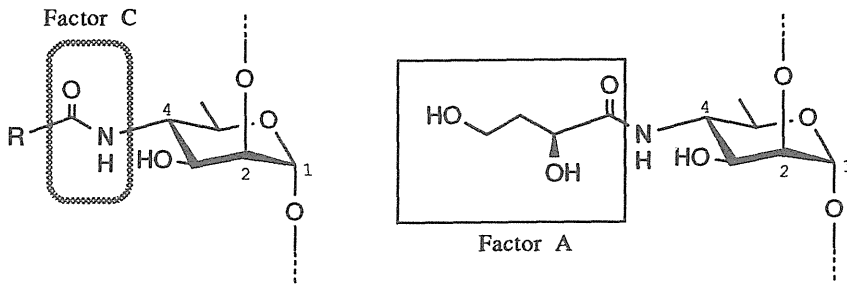
本章においては、現在そのO抗原関係が明らかとなっていないO9とHakataとの血清学的交叉反応原性を菌体とLPSの両レベルで追究した。さらに、イナバ型O1コレラ菌、O9、Hakataおよび1875 VariantのLPSとイナバおよびO9の両LPSを化学修飾して得た人工LPS抗原を用いて、O1コレラ菌のグループ抗原因子Aとイナバ抗原因子Cの抗原特異性を発現するLPS分子上の化学構造の解明を試みた。また、O1コレラ菌のO抗原構造を解析する新しいアプローチとして、LPSのO抗原特異多糖側鎖を構成するrepeating unitにPerNAc残基を持つO30群Salmonellaおよび腸管出血性大腸菌E. coli O157を用いて、これら菌株とHakataおよびイナバとのO抗原関係を菌体とLPSの両レベルで追究した。

本研究において、これまで不明であったO9とHakata間の血清学的交叉反応原性が明らかとされ、O1コレラ菌、O9およびHakataの3菌株間のO抗原関係を菌体とLPSの両レベルで完全に把握することができた。

O1コレラ菌のLPS O抗原特異多糖側鎖が $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合のN-3-deoxy-L-glycero-tetronylperosamine homopolymerで構成されていることがKenneら[10]によって報告されたにも拘らず、O1コレラ菌の各O抗原因子を発現する化学構造は、長年にわたって不明であった。しかし、本研究において、イナバ因子CとO1コレラ菌のグループ抗原因子Aを決定するLPS分子上の化学構造を解明することができた。すなわち、イナバ因子Cは、O1コレラ菌LPSのO抗原特異多糖側鎖を構成する $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合のperosamine homopolymerのperosamineがその種類を問わずN-acyl化されていることによって発現することが示された。さらに、O1コレラ菌のグループ抗原因子Aは、同homopolymerのperosamineが3-deoxy-L-glycero-tetronyl基でN-acyl化されることにより発現することが示された。このことは、イナバLPSのperosamine N-acylである3-deoxy-L-glycero-tetronyl(S-2,4-dihydroxybutyryl)基と最も類似したN-acyl構造を持つイナバおよびO9のN-But化LPSが、A因子血清に対して部分的に低い抗原性を発現することからも推測できる。今後、本研究で得られた見知を基礎として、イナバおよびO9LPSもしくはO抗原特異多糖側鎖が同homopolymerで構成されている他の菌株LPSのperosamine N-acyl基をO1コレラ菌LPSのそれと同一の

$\alpha(1\rightarrow 2)$ -linked *N*-acylated
perosamine homopolymer

O1 *V. cholerae* Inaba LPS



Scheme 1 Chemical entities of antigen factor A and C residing in O-antigen of O1 *V. cholerae*

3-deoxy-L-glycero-tetronyl基に変換した半合成O1コレラ菌LPSを調製し、その抗原性を検討することが有効であると思われる。また、O30群 *Salmonella* および *E. coli* O157 は、古くからO9および *B. abortus* と血清学的交叉反応性を示すが知られていた。本研究において、これら菌株は、さらにHakataとの間に強い血清学的交叉反応性を示すことが初めて明らかとされた。しかし、O30群 *Salmonella* および *E. coli* O157 は、イナバとは血清学的交叉反応性を示さないことが明らかとなった。この結果は、イナバ抗原因子Cは、*N*-acyl化された perosamine が $\alpha(1\rightarrow 2)$ 結合の homopolymerとして存在することによって発現することを示すものである。このことは、C因子抗原のエピトープ構造との相違に起因するものであるか、もしくはO30群 *Salmonella* および *E. coli* O157 LPSのO抗原特異多糖側鎖部に存在する perosamine とは異なる糖質による抗体結合の障害に起因するものであるかは本研究においては不明である。抗原抗体反応において、抗原の3次元構造は非常に重要なファクターとされている。従って、O1コレラ菌O抗原構造の3つのO抗原因子を発現する化学的本体を解明するにあたり、O1コレラ菌LPSを含むこれらLPSのO抗原特異多糖側鎖部の3次元構造に興味を持たれる。

第2章 オガワ特異抗原因子Bの解析

O1コレラ菌は、そのO抗原構造の相違から、オガワ型とイナバ型の2つの血清型に分けられ、この両者は菌体凝集反応と凝集素吸収試験によって確立されたO1コレラ菌のO抗原構造に関するABC conceptによって明らかに血清学的に区別できる。また、Hisatsuneら[40]は、両血清型O1コレラ菌LPSをSRBCの感作抗原として用いるPHおよび同LPSをインヒビターとして用いるPHI試験においても、凝集反応と凝集素吸収試験によって確立されたABC conceptを完全に支持する結果が得られることを報告している。従って、オガワおよびイナバLPSのO抗原特異多糖側鎖部の化学構造には明らかな相違が認められるはずである。しかしながら、両LPSのO抗原特異多糖側鎖の構造が、共にN-3dTetronyl 化されたPerNの $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合のhomopolymerで構成されていることが報告されて以来十数年が経過しているにもかかわらず、O1コレラ菌のただ2つの血清型であるオガワとイナバのLPS O抗原特異多糖側鎖構造の相違は未だ見いだされていない。

このような背景の中、本邦においてそのO抗原構造にオガワ特異抗原因子Bを持つ海水ビブリオ1875 Original (1875 Original)が、さらには、本菌のイナバ型変異株である海水ビブリオ1875 Variant (1875 Variant)が分離された[17]。1875 Originalは、そのO抗原にオガワ特異抗原因子Bを持つこと、さらにそのO抗原変異によって、B因子を欠損し、代ってC因子を強く発現するイナバ型の変異株を与えることから[17]、両菌株はO1コレラ菌O抗原構造の解析に非常に有用な手段となり得る。

本章では、O1コレラ菌のオガワ特異抗原因子Bを発現するLPS分子上の化学構造を明らかとする目的で、O1コレラ菌と1875のLPSを用い、それぞれイナバおよび1875 Variant LPSには存在しないオガワおよび1875 Original LPSの特異構成糖の検出を試みた。またさらに、オガワおよび1875 Original LPSの特異構成糖のLPSにおける結合様式をメチル化分析によって検討し、オガワおよび1875 Original LPSのオガワ特異構造の解析を試みた。

第1節 O1コレラ菌 LPS を用いたオガワ特異構成糖の発見と同定

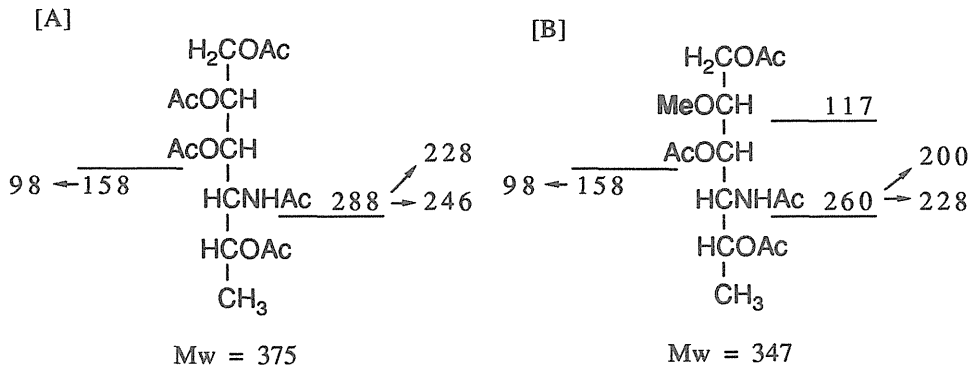
O1コレラ菌 LPSのオガワ特異構成糖を検出する目的で、オガワおよびイナバ LPS の分解産物に含まれる糖質をガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) によって詳細に分析した。さらに、オガワ LPSの HF-ソルボリシス産物より、オガワ特異構成糖を単離・精製し、 ^1H - および ^{13}C -NMRによってその構造を解析・確認した。

1-1 O1コレラ菌 LPS の塩酸加水分解物の分析

O1コレラ菌 LPSを Redmond [9]の方法に従って塩酸加水分解 (10 M 塩酸、90°C、15分間) した後、その加水分解物を N-acetylalditolacetate 誘導体として GC/MSによって分析した。

オガワおよびイナバの両 LPSから、そのO抗原特異多糖側鎖を構成する PerN の N-acetylalditolacetate 誘導体が検出された。Fig. 12にその EI-MSの結果を示した。PerNの同誘導体からはその特徴的なフラグメントとして m/z 158, 288 にフラグメントイオンピークが検出され、またにそれらの2次フラグメントイオンが m/z 98, 246, 228 に検出された。さらに、オガワ LPSに特異的に、2-O-methylperosamine (2MePerN)の同誘導体が検出された。Fig. 12 に示した様に、その EI-MSにおいて 2MePerNの同誘導体の特徴的なフラグメントイオンとして m/z 117, 158, 260 のフラグメントイオンピークが検出され、またそれらの2次フラグメントイオンが m/z 98, 200, 228 に検出された。しかし、イナバ LPSからは、2MePerN の同誘導体は検出されず、オガワ LPSにはその特異構成糖として 2MePerN が存在することが示唆された。

この 2MePerNが事実O1コレラ菌 LPSのオガワ特異構成糖であることを実証するために、7株のオガワ型O1コレラ菌株 LPSと5株のイナバ型O1コレラ菌株 LPS を用いて同様に検討した結果をTable 12に示した。数値は、2MePerN を1モルとした相対モル比で示した。使用した7菌株すべてのオガワ LPSから 2MePerN が検出され、その含量は共に検出された PerN の 1/19.4 ~ 1/30.4 であった。しかし、いずれのイナバ LPSからも、2MePerN は検出されなかった。すなわち、



Compound	Fragment ion, m/z (intensity, %)	Detected from
A	60(48.6), 74(23.3), 98(100.0), 126(59.1), 158(10.2), 168(39.8), 186(39.6), 228(32.5), 246(8.8), 288(25.8).	Ogawa and Inaba
B	60(16.7), 74(21.9), 98(81.0), 117(100.0), 128(74.4), 154(22.9), 158(8.3), 200(5.9), 228(16.4), 260(11.7).	Ogawa

Fig. 12 EI-mass data of *N*-acetylalditolacetate derivatives of perosamine [A] and 2-*O*-methylperosamine [B] detected in acid hydrolysate of O1 *V. cholerae* LPS

O1 コレラ菌のオガワ LPSには、イナバ LPSには存在しない特異構成糖質として 2MePerN が存在することが示された。

1-2 オガワ特異構成糖の N-acyl 基の検討

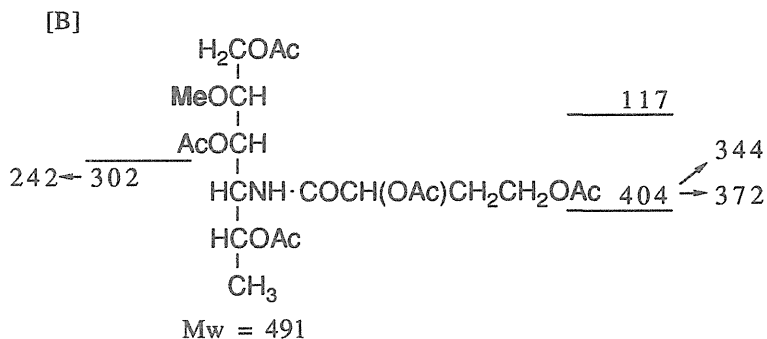
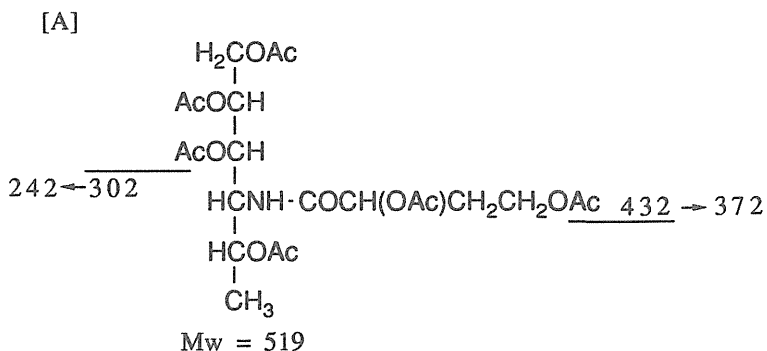
現在、LPS の構成糖として見いだされている PerN は、N-acyl化された状態で存在している。従って、オガワ LPSから見いだされた 2MePerNも当然N-acyl化されていることが予想される。そこで、N-acyl基を遊離することなくグリコシド結合を切断することができる HF-ソルボリシスを用いてオガワおよびイナバの PS を分解した後 N-acetylalditolacetate 誘導体として GC/MSによって分析した。

Table 12 Detection of 2-*O*-methylperosamine present in LPS isolated from various strains of *O1 V. cholerae*

The values are expressed as molar ratios relative to 1.0 mole of 2-*O*-methylperosamine.

Strain	2MePerN	PerN	2MePerN / PerN
Serotype Ogawa			
NIH41	+	+	1.0/22.6
NIH90	+	+	1.0/30.4
P1418	+	+	1.0/24.0
SLH-22	+	+	1.0/26.6
34D/13	+	+	1.0/22.8
Ubon 13	+	+	1.0/24.5
PE-1	+	+	1.0/19.4
Serotype Inaba			
35A3	-	+	
569B	-	+	
V86	-	+	
HP47	-	+	
C5	-	+	

オガワ及びイナバPSの HF-ソルボリシス産物から、そのO抗原特異多糖側鎖を構成する N-3-deoxy-L-glycero-tetronylperosamine (PerNTet) の N-acylalditol-acetate 誘導体が検出された。その EI-MSの結果を Fig. 13に示した。PerNTet の同誘導体からはその特徴的なフラグメントとして m/z 145, 302, 432 にフラグメントイオンピークが検出され、またそれらの2次フラグメントであるm/z 242, 372 にその特徴的なフラグメントイオンピークとそれらの2次フラグメントイオンがそれぞれ検出された。さらに、オガワ PS に特異的に、N-3dTetronyl 化された 2MePerN (2MePerNTet) の同誘導体が検出された。Fig.13 に示した様に、2MePerNTetの同誘導体からはその特徴的なフラグメントとして m/z 117, 302, 404 にフラグメントイオンピークが検出され、またそれらの2次フラグメントイオンが m/z 242, 344, 372に検出された。しかし、イナバ PS からは、2MePerNTetの同誘導体は、検出されなかった。すなわち、オガワ LPSの特異構成糖として見いだ



Compound	Fragment ion, m/z (intensity, %)	Detected from
A	84(32.9), 145(100.0), 187(48.1), 242(9.7), 302(4.4), 312(14.2), 330(12.8), 372(30.0), 390(3.2), 432(18.6).	Ogawa and Inaba
B	117(100.0), 145(20.1), 187(5.5), 242(3.4), 302(4.0), 344(4.1), 362(2.1), 372(9.4), 404(4.1).	Ogawa

Fig. 13 EI-mass data of *N*-acylalditolacetate derivatives of perosamine [A] and 2-*O*-methylperosamine [B] carrying *N*-3-deoxy-*L*-glycero-tetronyl group detected in products of HF-solvolysis of O1 *V. cholerae* Ogawa and Inaba PS

された 2MePerNは、LPS O抗原特異多糖側鎖を構成するPerNの N-acyl 基と同一である 3dTetronyl 基によって N-acyl 化されていることが示された。

1-3 オガワ特異構成糖の精製とその解析

オガワ PS の HF-ソルボリシス産物から見いだされたオガワ特異構成糖である 2MePerNTet を分離・精製し、NMR によって解析・確認した。

オガワ PS を HF-ソルボリシスした後、その産物を Sugar Pak-Pb (Waters, 7.8 x 300 mm) カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによって精製し、PerNTet および 2MePerNTet をそれぞれ 7.1 % および 0.3 % の収率で得た。

Table 13 にオガワ LPS から精製して得た PerNTet と 2MePerNTet の $^1\text{H-NMR}$ の結果を示した。PerNTet は、5.22、3.99、4.04、3.93、4.10、1.23、4.36、2.11、1.93 および 3.81 ppm の 10 本の強いシグナルとして観察され、その化学シフト値とカップリング定数から 4-(3-deoxy)-L-glycero-tetronamido-4,6-dideoxy- α -mannopyranose すなわち PerNTet であることが確認できた。この結果は、Kenne ら [41] の報告と良く一致していた。一方、2MePerNTet からは、PerN と N-3dTetronyl 基に由来する 10 本のシグナルに加えて 3.56 ppm にメトキシプロトンに由来するシグナルが観察された。

Table 14 にオガワ LPS から精製して得た PerNTet と 2MePerNTet の $^{13}\text{C-NMR}$ の結果を示した。PerNTet からは、PerN に由来する 6 本の強いシグナルとその N-acyl 基である 3dTetronyl 基に由来する 4 本のシグナルが観察された。この結果は、 $^1\text{H-NMR}$ の結果と同様に既報の結果と良く一致していた。一方、2MePerNTet からは、PerN と N-3dTetronyl 基に由来する 10 本のシグナルに加えて 58.35 ppm にメトキシカーボンに由来するシグナルが観察され、さらに、2MePerNTet の 2 位のカーボンに由来するシグナルが PerNTet のそれと比べ約 10 ppm 低磁場シフトしていることから、メトキシル基は PerN の 2 位に結合していることが示された。すなわち、オガワ LPS から見いだされた特異構成糖は、2MePerNTet であることが確認された。

さらに、精製して得た 2MePerNTet の D- および L- 立体配置を検討した。PerNTet および 2MePerNTet の全メチル化 S- (+) - および R- (-) - 2-butylglycoside 誘導体のガスクロマトグラフィー (GLC) における、全アセチル化 myo-inositol に対する相対保持時間 (T_{r1}) は、それぞれ 1.27 および 1.28 であった。これは、D- 立体配置である PerNTet の両誘導体と一致するものであった。また、それらの GC/MS 分

Table 13 ^1H -NMR data of *N*-3-deoxy-*L*-glycero-tetronyl- α -perosamine and *N*-3-deoxy-*L*-glycero-tetronyl-2-*O*-methyl- α -perosamine purified from O1 *V. cholerae* NIH 41 (Ogawa) LPS

The values are expressed as chemical shifts (ppm) relative to that of internal acetone (2.225 ppm). Coupling constants are given in parentheses (*J*, Hz). Spectra were recorded for samples in D₂O at 25°C (500MHz).

Compound	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-2'	H-3'a	H-3'b	H-4'	O-Me
PerNTet	5.22 (1.8)	3.99 (3.3)	4.04 (10.3)	3.93 (10.3)	4.10 (6.2)	1.23	4.36 (4.0) (8.4)	2.11 (4.8) (7.3)	1.93 (4.0)	3.81	-
2MePerNTet	5.38 (1.8)	3.63 (3.1)	4.07 (10.6)	3.87 (10.6)	4.06 (6.3)	1.22	4.35 (4.0) (8.4)	2.11 (5.5) (7.3)	1.93 (4.0)	3.81	3.56

Table 14 ^{13}C -NMR data of *N*-3-deoxy-*L*-glycero-tetronyl- α -perosamine and *N*-3-deoxy-*L*-glycero-tetronyl-2-*O*-methyl- α -perosamine purified from O1 *V. cholerae* NIH 41 (Ogawa) LPS

The values are expressed as chemical shifts (ppm) relative to that of internal acetone (-CH₃, 30.09 ppm). Spectra were recorded for samples in D₂O at 25°C (100.50MHz).

Compound	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	O-Me
PerNTet	93.53	69.52	70.16	52.54	66.62	16.53	176.78	68.59	35.50	57.41	-
2MePerNTet	90.37	79.40	70.51	52.99	66.51	16.51	176.72	68.60	35.50	57.43	58.35

析において観察されたフラグメントイオンもまたよく一致していた。すなわち、オガワ LPSから見出された 2MePerNTet の D-および L-立体配置は、その O 抗原特異多糖側鎖部を構成する PerNTet と同一の D- 立体配置であることが示された。

以上の結果から、O1 コレラ菌のオガワ LPS は、イナバ LPS には存在しない特異構成糖として、Fig. 14 に示す N-3-deoxy-L-glycero-tetronyl-2-O-methyl-D-perosamine を持つことが初めて明らかとなった。

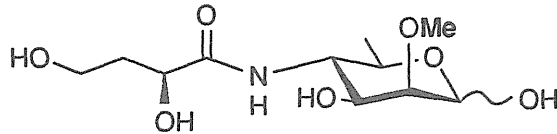


Fig. 14 Structure of *N*-3-deoxy-*L*-glycero-tetronyl-2-*O*-methyl-*D*-perosamine isolated from O1 *V. cholerae* Ogawa LPS

第 2 節 海水ビブリオ1875 LPSを用いた Original 特異構成糖の発見とその同定

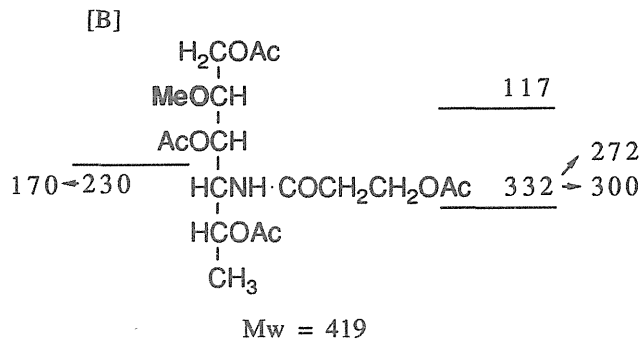
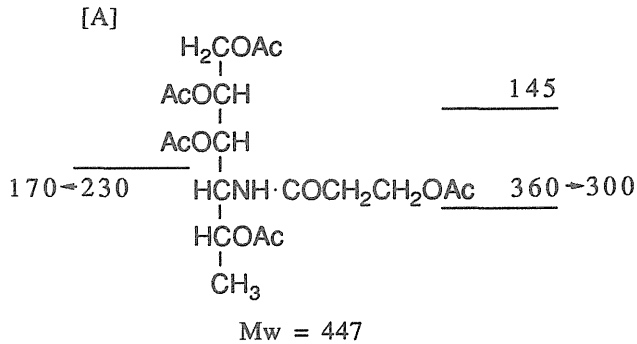
1875 Original は、その O 抗原構造にオガワ特異抗原因子 B を持っている。従って、1875 Original LPS にもまた、そのイナバ型変異株である 1875 Variant には存在しない特異構造が存在するはずである。また、1875 Original とオガワは、共に O 抗原構造に同一の B 因子を持つ以上、その抗原因子を決定する化学構造、すなわち 1875 Originalal LPS の特異構造はオガワのそれと類似していることが予想される。そこで、Original および Variant の両 1875 LPS を用いて、その HF-ソルボリシス産物から Original の特異構成糖の検出を試み、さらにその Original 特異構成糖を分離・精製し、その NMR による解析・確認を行なった。

2-1 1875 PS の HF-ソルボリシス産物の分析

1875 Original LPS の特異構成糖を検出する目的で、1875 PS を HF-ソルボリ

シスした後、その産物を *N*-acylalditolacetate 誘導体として GC/MSによって分析した。

1875 Original および 1875 Variant の両PSから、そのO抗原特異多糖側鎖を構成する *N*-3-hydroxypropionylperosamine (PerNOHP) の *N*-acylalditolacetate 誘導体が検出された。その EI-MSの結果を Fig.15 に示した。PerNOHP の同誘導



Compound	Fragment ion, m/z (intensity, %)	Detected from
A	56(79.3), 110(100.0), 170(7.2), 180(19.5), 230(3.6), 240(12.5), 300(20.5), 360(5.4).	Original and Variant
B	56(36.1), 110(38.9), 117(100.0), 170(7.9), 230(6.0), 240(6.2), 272(7.8), 300(20.7), 332(7.4).	Original

Fig. 15 EI-mass data of *N*-acylalditolacetate derivatives of perosamine [A] and 2-*O*-methylperosamine [B] carrying *N*-3-hydroxypropionyl group detected in products of HF-solvolysis of Marine vibrio bio-serogroup 1875 Original and Variant PS

体からはその特徴的なフラグメントとして m/z 145, 230, 360にフラグメントイオンピークが検出され、またそれらの2次フラグメントイオンが m/z 170, 300に検出された。また、1875 Original PSに特異的に、N-3-hydroxypropionyl-2-O-methylperosamine (2MePerNOHP) の同誘導体が検出された。Fig. 15 に示した様に、EI-MS において、2MePerNOHPの同誘導体に特徴的なフラグメントとして m/z 117, 230, 332 にフラグメントイオンピークが検出され、またそれらの2次フラグメントイオンが m/z 170, 272, 300に検出された。しかし、1875 Variant PS からは、2MePerNOHP の同誘導体は、検出されなかった。すなわち、1875 Original LPS には、1875 Variant LPSには存在しないその特異構成糖である 2MePerNOHP が存在することが示唆された。

2-2 1875 Original 特異構成糖の精製とその解析

1875 Original PS から見いだされた特異構成糖である 2MePerNOHP の単離・精製を行ない、NMR によって解析・確認した。

1875 Original PSの HF-ソルボリシス産物から、オガワ特異構成糖の精製と同様の方法で 2MePerNOHP を単離・精製し、PerNOHP および 2MePerNOHP をそれぞれ 10.5 % および 2.0 %の収率で得た。

Table 15に、精製して得た PerNOHPと2MePerNOHPの $^1\text{H-NMR}$ の結果を示した。PerNOHP は、5.15、3.92、3.88、3.88、3.94、1.18、2.52および 3.86 ppm の 8本のシグナルとして検出された。その化学シフト値とカップリング定数から4,6-dideoxy-4-(3-hydroxy)propionamido- α -mannopyranose すなわち PerNOHPであることが確認できた。また、2MePerNOHPからは、PerNTet に由来する 8本のシグナルに加えメトキシルプロトンに由来する 3.49 ppm のシグナルが観察された。

Table 16にその $^{13}\text{C-NMR}$ の結果を示した。PerNOHP からは、PerNに由来する 6本のシグナルが観察された。これらシグナルの化学シフト値は、PerNTet における結果とよく一致していた。さらに、その N-acyl 基である3-hydroxypropionyl 基に由来する 3本のシグナルが検出された。2MePerNOHPからは、PerNOHP に由来する 9本のシグナルに加え、メトキシル基に由来する 58.58 ppmのシグナルが観察された。また、2MePerNOHPの 2位のカーボンに由来するシグナルは、PerNOHP

Table 15 ^1H -NMR data of *N*-3-hydroxypropionyl- α -perosamine and *N*-3-hydroxypropionyl-2-*O*-methyl- α -perosamine purified from Marine vibrio bio-serogroup 1875 Original LPS

The values are expressed as chemical shifts (ppm) relative to that of internal acetone (2.225 ppm). Coupling constants are given in parentheses (*J*, Hz). Spectra were recorded for samples in D₂O at 25°C (500MHz). nr = Not resolved.

Compound	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-2'	H-3'	<i>O</i> -Me
PerNOHP	5.15 (1.8)	3.92 (3.1)	3.88 (9.2)	3.88 (10.1)	3.94 (6.1)	1.18	2.52 (6.1)	3.86	-
2MePerNOHP	5.31 (nr)	3.56 (4.0)	3.91 (10.4)	3.86 (10.4)	3.92 (6.1)	1.16	2.51 (6.1)	3.85	3.49

Table 16 ^{13}C -NMR data of *N*-3-hydroxypropionyl- α -perosamine and *N*-3-hydroxypropionyl-2-*O*-methyl- α -perosamine purified from Marine vibrio bio-serogroup 1875 Original LPS

The values are expressed as chemical shifts (ppm) relative to that of internal acetone (-CH₃, 30.09 ppm). Spectra were recorded for samples in D₂O at 25°C (100.50 MHz).

Compound	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	<i>O</i> -Me
PerNOHP	93.37	69.66	70.38	52.92	67.13	16.81	174.76	38.62	57.72	-
2MePerNOHP	90.53	79.53	70.39	52.92	66.99	16.69	174.70	38.60	57.71	58.58

のそのシグナルに比べ10.13ppm低磁場にシフトしていた。従って、2MePerNOHPから検出されたメトキシル基は、PerNOHP の2位に結合していることが示された。すなわち、1875 Original LPSから検出された特異構成糖は、2MePerNOHPであることが確認された。

さらに、精製して得た2MePerNOHPのD-およびL-立体配置を検討した。2MePerNOHP の全メチル化 S-(+)- および R-(-)-2-butylglycoside 誘導体の GLCにおける T_{R1} は、それぞれ 0.97 および0.99を示し、D-立体配置である PerNOHPのそれら誘導体と一致するものであった。また、それらの GC/MS分析において観察されたフラグメントイオンもまたよく一致していた。すなわち、1875 Original LPS から見出された 2MePerNOHP の D- および L- 立体配置は、そのO抗原特異多糖側鎖部を構成する PerNOHPと同一の D- 立体配置であることが示された。

以上の結果から、1875 Original LPS は、1875 Variantに存在しない特異構成糖として N-3-hydroxypropionyl-2-O-methyl-D-perosamine を持つことが示された (Fig.16)。従って、共にそのO抗原構造にオガワ特異抗原因子Bを持つO1コレラ菌オガワおよび 1875 Original LPSは、両菌株 LPS に共通な特異構成糖として N-acyl 化された 2MePerNを持ち、この特異構造がオガワ特異抗原因子Bを決定する LPS分子上の化学構造である可能性が示された。

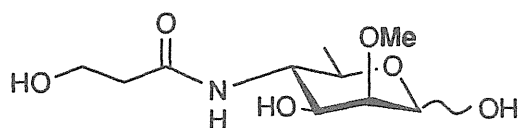


Fig. 16 Structure of N-3-hydroxypropionyl-2-O-methyl-D-perosamine isolated from Marine vibrio bio-serogroup 1875 Original LPS

第3節 O1コレラ菌および海水ビブリオ 1875 LPS のオガワ特異構造の解析

O1コレラ菌 LPS のオガワ特異構造の解明を目的として、オガワおよびOriginal LPS から特異的に検出された、それぞれN-3dTetronylおよびN-3-hydroxy-

propionyl 化された 2MePerN の LPSO 抗原特異多糖側鎖における結合様式を両PS のメチル化分析によって検討した。しかし、常法のメチル化分析では、分析段階におけるメチル化によって導入されたメチル基と LPS に本来存在する 2MePerN に由来するメチル基を区別することができない。そこで、重水素ラベルされたヨウ化メチル (CD₃I) を用いてメチル化分析を行なった。

3-1 オガワおよびイナバ PS のメチル化分析

オガワおよびイナバ PS の CD₃I を用いたメチル化分析によって検出された各誘

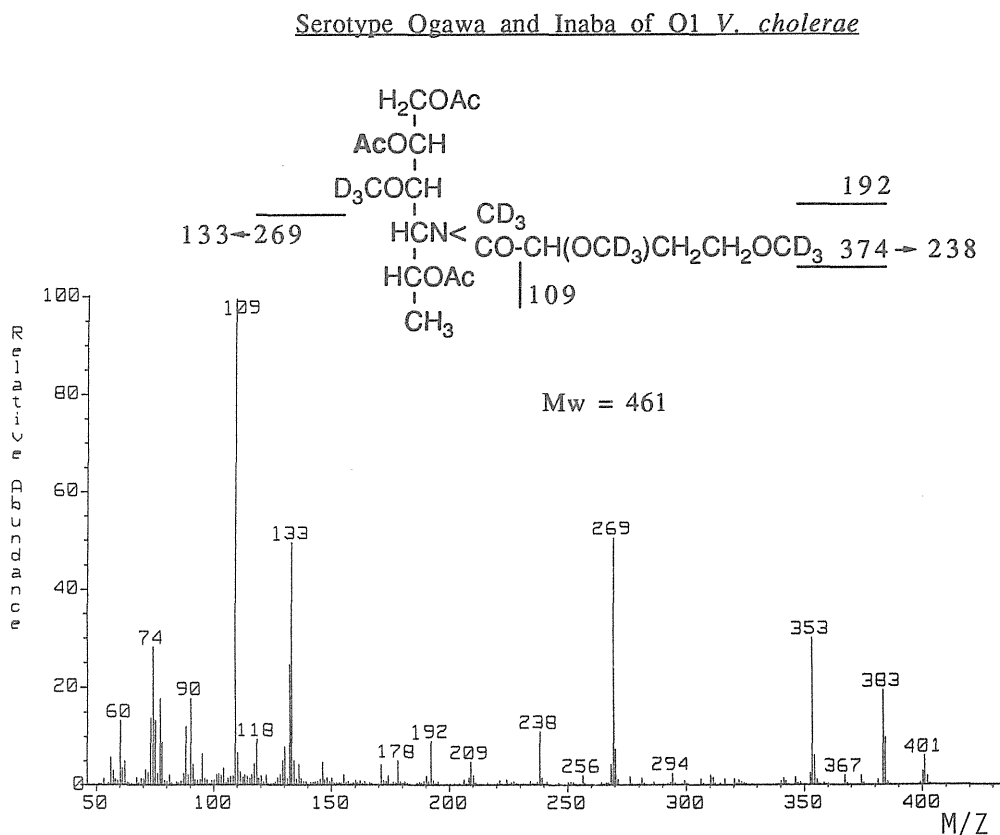


Fig. 17 EI-mass spectrum of partially methylated alditol acetate derivative of 2-O-substituted *N*-3-deoxy-L-glycero-tetronylperosamine detected by methylation analysis using CD₃I

導体の EI-MSの結果を Fig. 17~19に示した。

Fig. 17 に示した様に、オガワおよびイナバの両 PS から、そのO抗原特異多糖側鎖を構成する PerN homopolymer の2位に置換基を持つ PerNTetに由来する1, 2, 5 位にアセチル基を持つ誘導体が検出された。その EI-MSにおいて、同誘導体に特徴的なフラグメントとして m/z 109, 192, 269, 374 にフラグメントイオンピークが検出され、またそれらの2次フラグメントイオンが m/z 133, 238 に検出された。また、Fig. 18 に示した様に、イナバ PS からは、非還元末端の PerNtet に由来する1, 5 位にアセチル基を持つ誘導体が検出された。その EI-MSにおいて、同誘導体に特徴的なフラグメントとして m/z 109, 120, 167, 269,

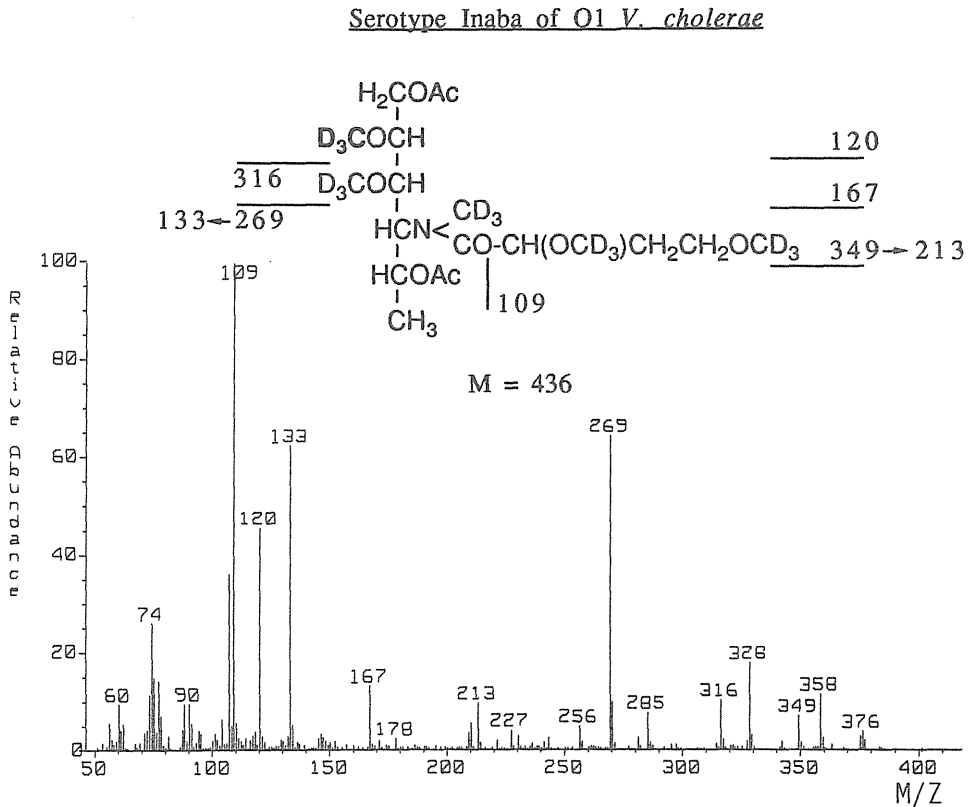


Fig. 18 EI-mass spectrum of partially methylated alditolacetate derivative of terminal *N*-3-deoxy-*L*-glycero-tetronylperosamine detected by methylation analysis using CD_3I

316, 349にフラグメントイオンピークが検出され、またそれらの2次フラグメントイオンが m/z 133, 213に検出された。しかし、オガワ PS からは、非還元末端の PerNTetに由来するこの誘導体は検出されず、代って非還元末端の2MePerNTetに由来する1,5位にアセチル基を持つ誘導体が検出された。Fig. 19 にその EI-MSの結果を示した。同誘導体からはその特徴的なフラグメントとして m/z 109, 117, 164, 269, 316, 346 にフラグメントイオンピークが検出され、またそれらの2次フラグメントイオンが m/z 133, 210 に高感度で検出された。また、PerNTet および 2MePerNTet に由来する他の誘導体は、検出されなかった。これらの結果は、オガワ LPS の特異構成糖として検出された 2MePerNTet は、そのO抗原特

Serotype Ogawa of O1 *V. cholerae*

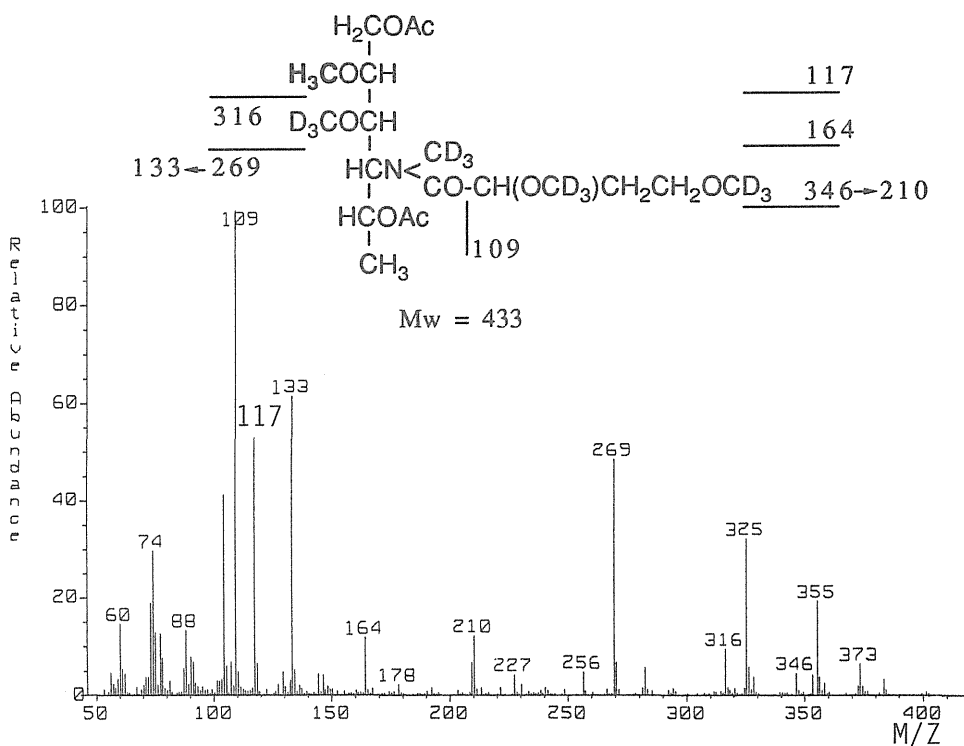


Fig. 19 EI-mass spectrum of partially methylated alditolacetate derivative of terminal *N*-3-deoxy-*L*-glycero-tetronyl-2-*O*-methylperosamine detected by methylation analysis using CD₃I

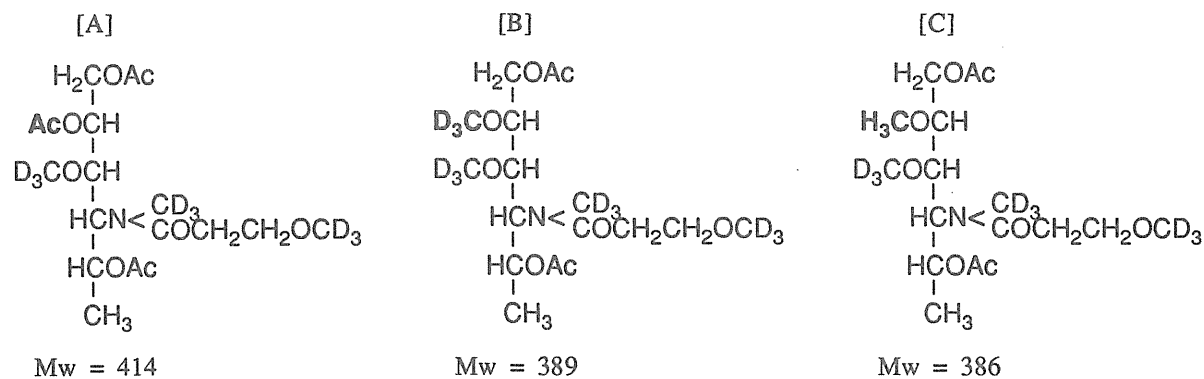
異多糖側鎖を構成するPerNTet homopolymer の分岐糖として存在することを否定するものであり、また、2MePerNTetも、置換基を持たない非還元末端糖として 1 分子のみ存在することを示している。

3-2 1875 Original および Variant PS のメチル化分析

1875 Original および Variant PS の CD₃I を用いたメチル化分析によって検出された各誘導体とその EI-MSの結果を Fig. 20 に示した。

1875 Original および Variantの両 PS から、2 位に置換基を持つ PerNOHPに由来する 1,2,5位にアセチル基を持つ誘導体が検出された。また、1875 Variantからは、非還元末端の PerNOHPに由来する 1,5位にアセチル基を持つ誘導体が検出された。しかし、1875 Original PS からは、非還元末端の PerNOHPに由来するこの誘導体は検出されず、代わって非還元末端の 2MePerNOHP に由来する 1, 5 位にアセチル基を持つ誘導体が検出された。また、他の PerNOHP および2MePerNOHP に由来する誘導体は検出されなかった。この結果は、オガワ LPSと同様に、1875 Original LPS の特異構成糖として検出された 2MePerNOHP は、その O 抗原特異多糖側鎖を構成する PerNOHPの homopolymerの非還元末端部に 1 分子のみ存在することを示している。

以上の結果から、Fig. 21 に示した様に、O 1 コレラ菌の 2 つの血清型であるオガワおよびイナバの LPSは、両 LPSの O 抗原特異多糖側鎖を構成する PerNTet の α (1→2) 結合の homopolymerの非還元末端部においてその構造が異なり、オガワ LPSにおいてのみその非還元末端部に 1 分子の 2MePerNTet が存在することが示された。また、その O 抗原構造にオガワ因子 B を持つ 1875 Original LPSもまた、Fig. 22 に示した様に、O 抗原特異多糖側鎖を構成する PerNOHPの α (1→2) 結合の homopolymerの非還元末端部において、そのイナバ型変異株である 1875 Varigant LPSとは異なり、1 分子の 2MePerNOHP が存在することが示された。すなわち、このオガワ特異構造である 2MePerNが、オガワ特異抗原因子 B を決定する化学的本体である可能性が強く示された。



Compound	Fragment ion, m/z (intensity, %)	Detected from
A	133(100.0), 145(2.2), 192(11.6), 209(4.3), 222(95.2), 238(15.4), 267(2.6), 327(10.3).	Original and Variant
B	120(64.6), 133(100.0), 167(13.1), 209(8.4), 222(89.2), 269(8.75), 302(7.3).	Variant
C	117(65.4), 133(100.0), 164(14.8), 209(8.4), 222(84.8), 239(8.5), 269(9.4), 299(9.1).	Original

Fig. 20 EI-mass data of partially methylated alditolacetate derivatives obtained by methylation analysis of PS from Marine vibrio bio-serogroup 1875 Original and Variant using CD₃I

O1 *V. cholerae* Ogawa LPS

O1 *V. cholerae* Inaba LPS

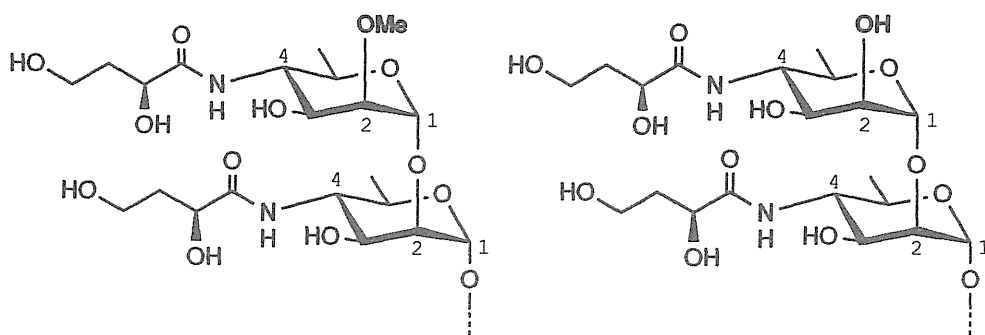


Fig. 21 Structures of O-specific polysaccharide chain of O1 *V. cholerae* Ogawa and Inaba LPS

1875 Original LPS

1875 Variant LPS

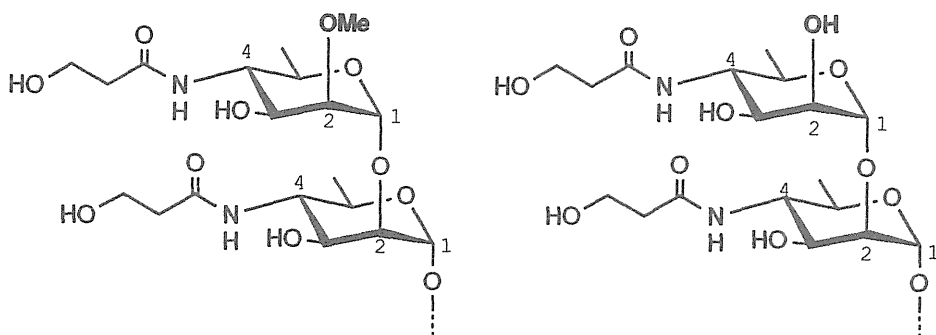


Fig. 22 Structures of O-specific polysaccharide chain of Marine vibrio bio-serogroup 1875 Original and Variant LPS

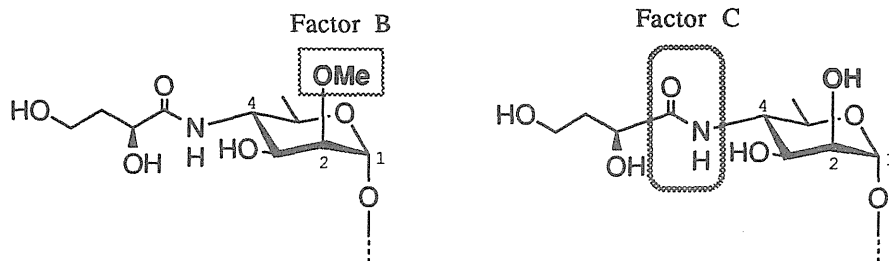
考察

本章においては、O 1 コレラ菌のオガワ特異抗原因子 B を決定する LPS分子上の化学構造の解明を目的として、オガワおよびイナバ型 O 1 コレラ菌 LPSのオガワ特異構造を解析し、またさらに、その O 抗原構造にオガワ特異抗原因子 B を持つ 1875 Originalとそのイナバ型変異株である1875 Variantの LPSを用いて1875 Original LPSのオガワ特異構造を解析した。

O 1 コレラ菌のただ 2つの血清型であるオガワとイナバの O 抗原特異性は、血清学的にはオガワ特異抗原因子 B とイナバ因子 C の発現によって決定される。O 1 コレラ菌の O 抗原は、その細胞壁外膜に局在する LPSの O 抗原特異多糖側鎖部の構造によって決定され、O 1 コレラ菌 LPSの抗原性は事実、凝集反応によって確立された ABC conceptを完全に支持するものである。イナバ因子 C を発現する LPS分子上の化学構造については本研究の第 1 章において明らかとした。オガワ特異抗原因子 B の化学的実体すなわちオガワおよびイナバ型 O 1 コレラ菌 LPS の化学構造の相違に関し、オガワ LPS はその特異構成糖として 4-amino-arabinoseを含むことが報告されている [42, 43]。しかし、その再現性が認められないこと [44]から、他の特異構成成分の存在が検討されてきた。また、化学分析とは異なったアプローチとして、オガワ特異性を発現する遺伝子領域の検出に代表される分子生物学的解析がなされ、それによって発現する酵素タンパクの同定が検討されてきた [45, 46, 47]。しかし、オガワ特異性を決定する LPS分子上の化学構造はこれまで解明されていなかった。

本研究では、O 1 コレラ菌 LPSのオガワ特異構成糖の検出を試み、その結果、オガワ特異構成糖として N-3-deoxy-L-glycero-tetronyl-2-O-methyl-D-perosamine を検出することに初めて成功した。さらに、その O 抗原にオガワ特異抗原因子 B を持つ 1875 Originalの LPSにおいても、そのイナバ型変異株である1875 Variant LPS には存在しない特異構成糖として 3-hydroxypropionyl-2-O-methyl-D-perosamineが検出されたことから、N-acyl化された 2-O-methyl-D-perosamine がオガワ特異抗原因子 B を発現する immunodominant sugar である可能性は極めて高いものと思われる。

また、オガワおよび 1875 Original LPSから見いだされた特異構成糖は、共に



Scheme 2 Chemical entities of antigen factor B and C residing in O-antigen of O1 *V. cholerae*

そのO抗原特異多糖側鎖部を構成する α (1 \rightarrow 2)結合の perosamine homopolymer の非還元末端部に1分子存在することが示された。言うまでもなく、イナバおよび1875 Variant LPSにはこの特異構造は存在しない。すなわち、このオガワおよび1875 Original LPSの非還元末端部のオガワ特異構造が、オガワ特異抗原因子を発現する化学構造であることが強く示唆された。さらに、オガワ型O1コレラ菌は、O抗原変異によって容易にオガワ特異抗原因子Bを欠損し、代わってイナバ抗原因子Cを発現する[4]。この事実は、海水ビブリオ1875 Originalの場合においても観察される[17]。従って、前述のイナバ抗原因子Cを決定するLPS分子上の化学構造もまたオガワ特異抗原因子Bのそれと同様にO1コレラ菌LPSのO抗原特異多糖側鎖部の非還元末端部に存在することが示唆される。一般に、LPS O抗原特異多糖側鎖部の非還元末端構造は、そのO抗原特異性の発現に極めて重要とされている。また、Bundleら[48]は、*B. abortus* LPSのO抗原特異多糖側鎖部を構成する α (1 \rightarrow 2)結合のN-formyl perosamine homopolymerの3次元構造を解析し、糖鎖骨格を中央に、N-formyl基を外部に突出したらせん状に糖鎖を伸展していることを報告しており、Fig. 23に示した様に、糖鎖骨格を同じくするO1コレラ菌LPSも同様の構造を持つことが予想される。従って、糖鎖部分においてはperosamine backboneを認識することが困難となり、本研究において示された、オガワおよびイナバ型O1コレラ菌LPSの非還元末端構造の相違が明瞭なO抗原特異性すなわち、オガワ特異抗原因子Bとイナバ抗原因子Cを発現するものとする。今後、本研究の結果を基礎とする、O1コレラ菌LPSの3次

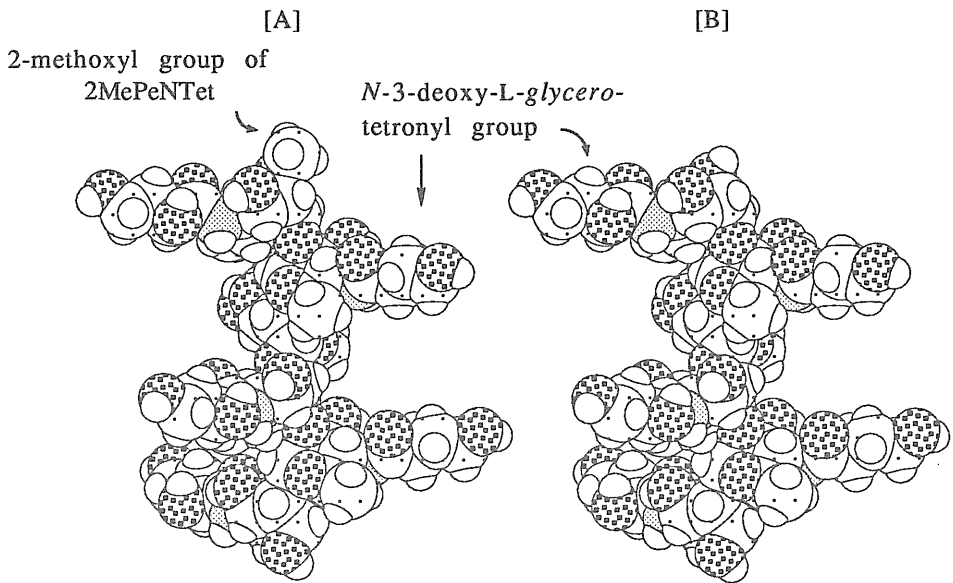


Fig. 23 Three dimensional models of proposed non-reducing parts of perosamine homopolymers constituting the O-specific polysaccharide chain of O1 *V. cholerae* Ogawa [A] and Inaba [B] LPS

元構造の解析と 2-O-methyl-D-perosamineを非還元末端に持つperosamine homopolymer の種々の合成アナログ体を用いた免疫化学的検討に興味を持たれる。

前述の様に、急性伝染病コレラを撲滅させるためには、副作用のない真に有効なコレラワクチンの開発は必須である。現在まで、死菌および生菌の経口コレラワクチンの開発研究がなされて来た。しかしながら、副作用の下痢や長期効果が得られないことなど、いずれも満足すべき結果が得られないのが現状である。一方、O1コレラ菌 LPSは、強力な抗菌抗体すなわち Vibriocidal抗体を産生することがFinkelstein[2]によって報告され、さらにその抗体は明瞭にO1コレラ菌のO抗原特異性を示すことが知られている。このことは、この抗菌抗体は、O1コレラ菌のO抗原に対して産生されることを示している。また、Hisatsuneら[15]およびTokunagaら[16]は、O1コレラ菌 LPSとコレラトキソイドの複合体を合成し、そのマウス腹腔内および経口投与によって高い抗菌・抗毒素抗体を産生することを報告している。これらの事実は、経口投与可能な新型コレラワクチン(コンポーネントワクチン)の開発の可能性を示すものである。しかし、Gupta

ら[49]が指摘する様に、ワクチンとして有効な LPS-コレラトキソイド複合体の合成には、O1 コレラ菌O抗原の化学的実体を解明することが必須の条件であった。従って、本研究によって得られた成績を基礎とする、安全で副作用の低い真に有効な新型経口コレラワクチンの開発に期待が持たれる。

総 括

本研究では、O1 コレラ菌のO抗原因子 A,BおよびC因子を決定する LPS 分子上の化学構造を明らかとする目的で以下の実験を行なった。従来報告されていないNon-O1 コレラ菌 serogroup Hakata と *Y. enterocolitica* O9 との血清学的交叉反応原性を菌体凝集反応と凝集素吸収試験によって検討し、さらに、この血清学的交叉反応原性を LPS レベルで受身溶血試験によって検討した。また、O1 コレラ菌のイナバ抗原因子Cを決定する LPS分子上の化学構造を解明する目的で、イナバ型O1 コレラ菌およびO9 LPS の化学修飾を行ない天然には存在しない全く新しい人工抗原 LPS を調製し、これら人工 LPS 抗原の抗原特異性と Hakataおよび海水ビブリオ 1875 Variant に対する血清学的交叉反応原性の変化を受身溶血反応と受身溶血阻止試験によって追究した。また、同人工 LPS抗原を用いた受身溶血反応と受身溶血阻止試験によって、O1 コレラ菌のグループ抗原因子A を決定する LPS分子上の化学構造の解明をも併せて試みた。さらに、そのLPS O抗原特異多糖側鎖部の部分構造に *N*-acetylperosamine を持つ、O30 群 *Salmonella* および腸管出血性大腸菌大腸菌 *E. coli* O157 とイナバおよび Hakataとの血清学的交叉反応原性を菌体と LPSの両レベルで検討することによって、イナバ抗原因子Cの化学的実体をさらに追究した。また、オガワ特異抗原因子Bを決定する LPS 分子上の化学構造を解明する目的で、O1 コレラ菌 LPSのオガワ特異構造の解明を試みるとともに、そのO抗原構造にオガワ因子Bを持つ 1875 Original LPS の、そのイナバ型変異株である 1875 Variant の LPSには存在しない、オガワ特異構造の解明を試みた。

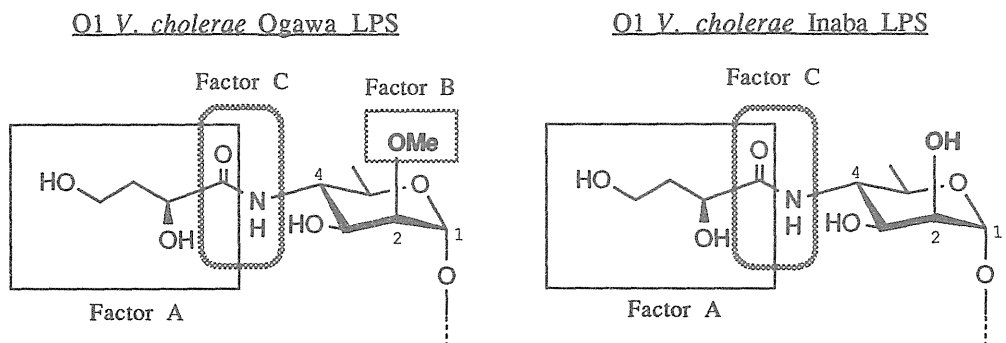
HakataとO9は、菌体と LPSの両レベルにおいて明瞭な血清学的交叉反応原性を示し、O1 コレラ菌を含む3菌株間のO抗原関係が明らかとされた。

イナバおよびO9 LPS の化学修飾によって、 α (1→2)結合 *N*-acetyl、*N*-propionylおよび *N*-butyrylperosamine homopolymerをそのO抗原特異多糖側鎖部に持つ人工抗原 LPSを調製し、さらにこれら人工 LPS抗原の化学的性状を検討した結果、その糖鎖構造には影響を与えることなく perosamine の *N*-acyl 基のみが変換されていることが示された。調製した人工 LPS抗原を用いた受身溶血反応と受身溶血阻止試験において、これら人工 LPS抗原は抗イナバ、抗 Hakata および

抗 1875 Variant 血清に対して強い血清学的交叉反応性を示した。すなわち、イナバ抗原因子Cを顕著に発現することが示された。従って、イナバ抗原因子Cの本体は、化学的にはO1コレラ菌、Hakata、O9および1875 LPSのO抗原特異多糖側鎖部を構成する $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合の perosamine homopolymer がその種類を問わず N-acyl 化されていることによって発現することが示された。さらに、A 因子血清を用いた受身溶血反応と受身溶血阻止試験において、イナバ LPSのグループ抗原因子Aは、LPSを N-deacyl 化することによって消失し、さらに N-deacyl化 LPSを N-acyl 化して得た人工 LPS抗原においても発現しないことが示された。すなわち、O1コレラ菌の共通抗原因子Aは、O1コレラ菌 LPS のO抗原特異多糖側鎖部を構成する perosamine homopolymer が3-deoxy-L-glycero-tetronyl基によって N-acyl化されていることによって発現することが示された。

一方、O30群 Salmonella および *E. coli* O157 は、菌体と LPSの両レベルにおいてHakataとの間に明瞭な血清学的交叉反応性を示すが、イナバとの間にはその血清学的交叉反応性を示さなかった。この結果は、O30群 Salmonella および *E. coli* O157 LPS は、そのO抗原構造にイナバ因子Cを持たないことを示すものであり、イナバ因子Cは N-acyl 化された perosamine が $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合の homopolymerとして存在することによって発現することが示唆された。

オガワ LPSは、O1コレラ菌 LPSのオガワ特異構造としてその LPS O抗原特異多糖側鎖の非還元末端部に1分子の N-3-deoxy-L-glycero-tetronyl-2-O-methyl-



Scheme 3 Chemical entities of antigen factors residing in O-antigen of O1 *V. cholerae*

D-perosamineを持つことが示された。さらに、1875 Original LPS においても、1875 Variant LPSには存在しない 1875 Original特異構造としてそのO抗原特異多糖側鎖の非還元末端部に1分子の N-3-hydroxypropionyl-2-O-methyl-D-perosamineを持つことが示された。従って、オガワおよび 1875 Original LPSのO抗原特異多糖側鎖の非還元末端部に特異構造として共通に存在する N-acyl 化された 2-O-methyl-D-perosamineが、オガワ特異抗原因子Bの化学的本体であることが強く示唆された。また、オガワのO抗原変異の様式から、前述のイナバ抗原因子Cの抗原決定部位はオガワ特異抗原因子Bのそれと同様にO1コレラ菌 LPSのO抗原特異多糖側鎖の非還元末端部に存在することが示唆された。

以上、本研究によって、O1コレラ菌のO抗原構造を構成するO1コレラ菌のグループ抗原因子A、オガワ特異抗原因子B およびイナバ抗原因子Cのそれぞれの活性を発現するLPS分子上の化学構造が明らかとされた。今後、本研究で得られた知見を基礎とした、O1コレラ菌 LPS を用いた新型コレラワクチンの開発に代表されるO1コレラ菌 LPSの医学的応用研究に期待が持たれる。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師 城西大学薬学部微生物学教室 久恒和仁 教授に深く感謝致します。

血清学的研究に際し有益な御指導、御助言、ならびに貴重な因子血清を御分与頂いた国立予防衛生研究所 島田俊雄 博士、理化学研究所 小迫芳正 博士に深謝致します。

NMR スペクトルの測定に当って、御助言、御協力を賜りました国立衛生試験所 薮島由二 博士に心より感謝致します。

また、数々の有益かつ適切な御助言、御指導を賜りました城西大学 野崎祐勝 助教授、近藤誠一 講師、井口毅裕 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薬学部微生物学教室の諸氏に感謝致します。

NMR スペクトルおよび GC/MSの労をとられました城西大学機器センターの諸氏に深く感謝いたします。

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 森田豊 教授、副査 城西大学 横江一朗 教授、副査 城西大学 斎藤節生 助教授に深謝致します。

実験の部

実験の部

一般事項

1. 使用菌株

本研究に使用した菌株とその由来および培養条件を Table E1 に示した。菌株は、それぞれの至適条件で振盪培養し、120℃、20分加熱殺菌した後、遠心分離により集菌した。得られた菌体は、蒸留水で3回洗浄した後、アセトン乾燥菌体とした。

Table E1 使用菌株と培養条件

菌株	由来	培養条件
<u>O1 <i>Vibrio cholerae</i></u>		
serotype Ogawa		
NIH41	1	普通ブイヨン培地 (pH 7.8) 37℃、16 時間
NIH90	1	〃
P1418	2	〃
SLH-22	3	〃
34D/13	3	〃
Ubon 13	3	〃
PE-1	3	〃
serotype Inaba		
569B	4	〃
35A3	1	〃
V86	5	〃
HP47	3	〃
C5	3	〃
<u>V. cholerae</u>		
serogroup Hakata 487-85		
	6	普通ブイヨン培地 (pH 7.8) 37℃、16 時間
<u><i>Vibrio</i> bio-serogroup 1875</u>		
Original	6	1.5 % 食塩加普通ブイヨン培地 (pH 7.8) 28℃、16 時間
Variant	6	〃

菌株	由来	培養条件
<u>Yersinia enterocolitica</u>		
O 9 Te-21	7	普通ブイヨン培地 (pH 7.0) 28°C、24 時間
<i>Salmonella urbana</i> Rohde	8	普通ブイヨン培地 (pH 7.0) 37°C、16 時間
<i>Salmonella soerenga</i> 871K	8	〃
<u>Escherichia coli</u>		
O 157:H19 A2	6	〃

1) 大友信也博士 (化学および血清療法研究所・熊本) . 2) 大橋誠博士 (東京都立衛生研究所・東京) . 3) 霜鳥翔一博士 (九州大学医学部・福岡) . 4) Dr. R.A.Finkelstein (Department of Microbiology, School of Medicine, University of Missouri-Columbia, USA) . 5) 合田朗博士 (北里大学衛生学部・東京) . 6) 島田俊雄博士 (国立予防衛生研究所細菌部・東京) . 7) 緒方幸雄博士 (杏林大学医学部・東京) . 8) 田村和満博士 (国立予防衛生研究所細菌部・東京) .

2. LPS の抽出・精製

LPS は、アセトン乾燥菌体から Westphal ら [50] のフェノール・水抽出法により抽出した。

アセトン乾燥菌体 (30 g) を 1.0 l の 45 % フェノールに懸濁した後、65°C で Ultra-turax を用いて 5 分間激しく攪拌した。懸濁液は、氷水中で 10 °C に冷却した後、遠心分離 (14,000 x g, 20 分) により水層、フェノール層および菌層に分離した。得られた水層とフェノール層を分取した後、45% フェノールを再び菌層に加え、更に前述の抽出操作を 2 回繰り返した。得られた水層とフェノール層は一夜透析した後、減圧下 100 ml に濃縮し、各濃縮液の超遠心分離 (105,000 x g, 14 時間) によって得られた沈渣を粗 LPS とした。粗 LPS は、蒸留水に溶解した後、超遠心分離の反復 (105,000 x g、3 時間、6 回) により精製した。O1 コレラ菌、海水ビブリオ 1875、E. coli O157 および *S. urbana* は水層由来の LPS、Hakata、Y. enterocolitica O 9 および *S. soerenga* はフェノール層由来の LPS をそれぞれ用いた。(収率:1.4~4.4 %)

3. LPS 多糖部の調製

O1 コレラ菌、海水ビブリオ 1875 および *Y. enterocolitica* O9 LPS の多糖部 (PS) は、Galanos ら [51] の方法に従って調製した。

LPS (500 mg) を 5% 酢酸に溶解 (50 mg/ml) し、不溶性のリピド A が遊離するまで (2~4 時間) 100 °C で加水分解した。反応液は、遠心分離 (15,000 x g, 15分) によりリピド A を除去した後、蒸発乾固して degraded polysaccharide (DPS) 画分とした。得られた DPS画分は、Sephadex G-50 Gel-filtration (2.6x 100 cm、溶出液: 蒸留水) により分画して PS を得た。(収率: 17.9~49.0 %) 検出器には示差屈折率計 (Shimadzu, RID-6A) を用いた。

4. 化学分析法

糖質は、以下に示した方法で誘導体化した後ガスクロマトグラフィー (GLC) およびガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) によって分析した。

4-1 中性糖の分析

試料 500 μ g を 0.5 ml の 2N トリフルオロ酢酸に溶解し、120 °C、1 時間加水分解した後、減圧下蒸発乾固した。残渣は、蒸留水に溶解し水素化ホウ素ナトリウムで還元した後、ピリジン/無水酢酸 (1:1) で全 acetyl 化して alditol-acetate 誘導体とし、プログラム 1 の条件で GLC および GC/MS を行なった。フルクトースは、試料 500 μ g を 5% 酢酸で 100 °C、2 時間加水分解し、Mawhinney ら [52] の方法に従って 2-O-methyloxime 化した後、ピリジン/無水酢酸 (1:3) で全 acetyl 化し、O-acetyl-O-methyloxime 誘導体として前述と同様の条件で GLC および GC/MS を行なった。

4-2 アミノ糖の分析

試料 500 μ g を 0.5 ml の 4N 塩酸で 100°C、16時間加水分解した後、減圧下蒸発乾固し、1%炭酸水素ナトリウム水溶液に溶解後、無水酢酸 (20 μ l) を加えて N-acetyl 化した。反応液は減圧下蒸発乾固した後、前述と同様に還元し全 acetyl 化して N-acetylalditolacetate 誘導体として、プログラム 2 の条件で GLC および GC/MS を行なった。

4-3 N-acyl 化 perosamine の分析

N-acyl 化 perosamine は、N-acyl 基を遊離することなくグリコシド結合を切断することができる無水フッ化水素 (HF) ソルボリシス [53] によって試料を分解した後分析した。

試料 500 μ g を 0.5 ml の HF に溶解し、0°C、3時間攪拌した後、10倍量の冷却したジエチルエーテルを加え、更に 2 g の炭酸カルシウムを加えて HF を中和した後、窒素気流下で蒸発乾固した。糖質 (glycosyl fluoride) は、蒸留水で抽出した後、80°C、30 分間加水分解し、前述と同様に還元後全 acetyl 化して N-acylalditolacetate 誘導体とし、プログラム 3 の条件で GLC および GC/MS を行なった。

4-4 比色定量法

heptose は Osborn のシステイン・硫酸法 [54]、2-keto-3-deoxyoctonic acid (KDO) は Weissbach の過ヨウ素酸・チオバルビツール酸法 [55] により定量した。それぞれの標準物質として D-glycero-D-talo-heptose (Aldrich, USA) および KDO (Sigma, USA) を用いた。

5. メチル化分析

PS のメチル化は、Hakomori の方法 [56] に従って行なった。カルバニオンは、

500 μ g の水素化カリウム懸濁液 (35%, Aldrich) を石油エーテルで 3 回洗浄した後、減圧下乾燥し 2.5 ml のジメチルスルフォキシドを加えて調製した。

試料 2 mg を 0.2 ml のジメチルスルフォキシドに溶解し、0.4 ml のカルバニオンを加えて室温で 4 時間攪拌した後、氷冷下 0.8 ml のヨウ化メチルを加え、室温で 3 時間攪拌した。反応液は、減圧下ヨウ化メチルを除去した後、20 ml の蒸留水に懸濁させ、Sep-Pak C₁₈ カートリッジ (Waters, USA) に吸着させた。このカートリッジを 20 ml の蒸留水で洗浄した後、20 ml の無水メタノールで溶出し、減圧下蒸発乾固して全メチル化 PS を得た。

全メチル化 PS は、0.5 ml の HF に溶解した後、0 °C、3 時間ソルボリシスし、HF を減圧下完全に除去した。残渣は、0.5 ml の蒸留水に溶解し、80 °C、30 分間加熱処理した。得られた糖質は、水素化ホウ素ナトリウムで一夜還元した後、ピリジン/無水酢酸 (1:1) で全 acetyl 化し Table E2 に示したプログラム 4 の条件で GC/MS によって分析した。

6. GLC および GC/MS

GLC は、Shimadzu GC-14A ガスクロマトグラフを用いて Table E2 に示した分析条件により行なった。検出器には水素炎イオン化型検出器 (FID) を用いた。GC/MS は、DX-300 (日本電子) を使用し、GLC と同様の条件で測定した。Electron impact mass spectrometry (EI-MS) はイオン化電圧 70 eV で測定し、Chemical ionization mass spectrometry (CI-MS) には反応ガスとしてイソブタンを用いた。糖質は、xylose (和光純薬) を内部標準物質として用い、ピーク面積法により定量した。

Table E2 GLC および GC/MS の分析条件

プログラム	カラム	カラム温度	インジェクション温度
1	DB-210	180 ~ 240, 5 °C / 分	250 °C
2	ULBON HR-52	180 ~ 240, 4 °C / 分	250 °C
3	ULBON HR-52	180 ~ 300, 5 °C / 分	250 °C
4	ULBON HR-52	150 ~ 320, 5 °C / 分	250 °C

DB-210 (0.25 mm x 30 m, J&W Scientific, CA, USA)

ULBON HR-52 (0.25 mm x 25 m, Shinwa Chemical Industries, LTD)

7. 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

7-1. ^{13}C -NMR スペクトル

試料は、重水 (99.9 atom % D, Aldrich) で凍結乾燥後再び重水に溶解しクロマトグラフ用ガラスウールで不溶物を除去した後、5 mm ϕ の測定管に封入した (液高 4 cm)。測定は Varian Gemini 300S もしくは日本電子 α -500 を使用し、それぞれ共鳴周波数 75.00 MHz および 125.65 MHz でアセトン (和光純薬) を内部標準物質としてそのシグナル ($-\text{CH}_3$) を 30.09 ppm に固定して測定した。各シグナルは、C-H COSY によって帰属した。C-H カップリング定数 ($J_{\text{C-H}}$) は、Gated decoupling mode で測定して求めた。

7-2. ^1H -NMR スペクトル

測定試料は、前述と同様に調製した。測定は Varian Gemini 300S もしくは日本電子 α -500 を使用し、それぞれ共鳴周波数 300.00 MHz および 500.00 MHz でアセトン (和光純薬) を内部標準物質としてそのシグナルを 2.225 ppm に固定して測定した。各シグナルは、H-H COSY によって帰属した。

第 1 章に関する実験

1. LPS および PS の化学修飾

1-1 N-deacyl 化

PS の N-deacyl (N-dAcyl) 化は、Caroffら [26] の方法に従って行なった。試料 200 mg を 0.1 % 水素化ホウ素ナトリウムを含む 2 M 水酸化ナトリウム水溶液 20 ml に溶解し、100 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間加熱した。反応液は氷冷下 2 M 塩酸で中和した後透析し、その内液を遠心分離 (15,000 \times g, 15 分) し不溶物を除去した上清を減圧下に蒸発乾固した。残渣は蒸留水に溶解した後 Sephadex G-50 Gel-filtration

(1.3 x 100 cm, 溶出液：蒸留水) により分画し、得られた多糖体画分を N-dAcyl PSとした。(収率：42~63 %)

LPS の N-dAcyl化は下記の様に行なった。試料 200mgを前述と同様に N-dAcyl化し、透析後その透析内液を遠心分離 (15,000 x g, 15分) した。沈渣を20 ml の蒸留水に懸濁した後、トリエチルアミンを加えて可溶化し、蒸留水に透析した。その内液を遠心分離 (15,000 x g, 15 分) して不溶物を除去した後、凍結乾燥して N-dAcyl化LPS とした。(収率：53~60 %)

1-2 N-acetyl 化

N-dAcyl PSの N-acetyl (N-Ac) 化は Lüderitz [36]の方法に従って行なった。試料 50 mgを 10 mlの 1 %炭酸水素ナトリウム水溶液に溶解し、300 μ lの無水酢酸を加え室温で1時間攪拌した。反応液を蒸留水に透析し、遠心分離 (15,000x g, 15 分間) して不溶物を除去した後、減圧下蒸発乾固した。残渣は、蒸留水に溶解した後Sephadex G-50 Gel-filtration(1.3 x 100 cm, 溶出液：蒸留水) により分画し、得られた多糖体画分を N-Ac PSとした (収率：90~92 %)。N-dAcyl 化 LPSの N-Ac 化は、下記の様に行なった。試料 50 mg を前述と同様に N-Ac 化し、反応液を透析した。透析内液を遠心分離して不溶物を除去した後、凍結乾燥して N-Ac LPS を得た (収率：110 ~118 %)。

1-3 N-propionyl 化と N-butyryl 化

N-dAcyl 化 PS および LPS の N-propionyl (N-Pro)化と N-butyryl (N-But) 化は、N-hydroxysuccinimide を用いた活性化エステル法[37]により行なった。

活性化エステルは、以下に示した方法で調製した。それぞれ 100 μ l のプロピオン酸および酪酸に、300 mgのN-hydroxysuccinimideを含むジオキサン溶液2 ml と 600 mg の水溶性カルボジイミド [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] を含むジオキサン/メタノール混合溶液 (1 : 1, 3 ml) を加え、25 $^{\circ}$ C、2時間水浴中で攪拌した。反応液は、減圧下蒸発乾固し、10 ml のベンゼンに懸濁した後、吸引濾過し、濾液を減圧下蒸発乾固した。残渣は、シ

リカゲル (Kieselgel 60, Merck)・カラムクロマトグラフィー (1.3 x 30 cm, ベンゼン/アセトン、50 : 1) で精製し、プロピオン酸および酪酸の活性化エステルを得た (収率 : 45~50 %)。

N-dAcyl 化 PS の N-Proおよび N-But化は、試料 50 mgを 10 mlの50 mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) に溶解した後、45 mg のプロピオン酸及び酢酸の活性化エステルを加え、25°C、3時間水浴中で攪拌し、再び同量の活性化エステルを加え、さらに 16 時間攪拌した。反応液は、透析後減圧下蒸発乾固し、Sephadex G-50 Gel-filtration (1.3 x 100 cm, 溶出液 : 蒸留水) により分画し、その多糖体画分を凍結乾燥して N-Proおよび N-But PS とした (収率 : 85~95 %)。

N-dAcyl 化 LPSの N-Proおよび N-But化は、以下の方法で行なった。試料 50 mgを前述と同様に N-Proおよび N-But化した後透析し、その透析内液を遠心分離 (15,000 x g, 15 分) して不溶物を除去した後、凍結乾燥して N-Proおよび N-But LPS とした (収率 : 101 ~116 %)。

2. 血清学的手法

2-1. 抗血清の調製

本研究に使用した抗血清は、Shimada と Sakazaki [57]の方法に従って調製した。カシトン培地で 37 °C、16時間培養した各菌株を滅菌生理食塩水に懸濁し、100 °C、2 時間加熱処理した後、滅菌生理食塩水で 3 回洗浄した。菌体は、620 nmにおける濁度が 1.0 (2×10^8 個/ml) になるように滅菌生理食塩水に懸濁して免疫抗原とした。免疫は、0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ml の免疫抗原をそれぞれ 4 日間隔で家兎に静脈投与した。最終の投与から 1 週間後に再び 4.0 ml の免疫抗原を投与し、更にその 1 週間後に心臓採血して抗血清を得た。得られた抗血清は、V. cholerae CA 385 を用いて R- 抗原に対する抗体を吸収 (後述) した後、血清学的実験に供した [57]。

2-2. 凝集反応と凝集素吸収試験

凝集反応と凝集素吸収試験は、Sakazakiと Donovan [3] の方法に従って行なった。菌株は、前述の条件で培養した後、各菌株を滅菌生理食塩水に懸濁し、100℃、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 (2×10^8 個/ml) 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、0.25 mlの抗血清の2倍希釈列に0.25 mlの抗原液を加え、50℃、14時間反応させた後判定した。抗血清の希釈液には0.425% 滅菌食塩水を用いた。凝集素吸収試験は、全菌抗血清に前述と同様に処理した菌体を懸濁し、50℃、30分間反応させた後、遠心分離(10,000 x g, 15分)によって吸収抗原を除去した。この操作を3回繰り返した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。

2-3. 受身溶血試験と受身溶血阻止試験

受身溶血(PH)試験および受身溶血阻止(PHI)試験は、Hisatsuneら[40]の方法に従って行なった。両試験における希釈および洗浄液としては、0.15 mM塩化カルシウム、0.5 mM塩化マグネシウムおよび0.83%塩化ナトリウムを含む0.25 mMバルビタール緩衝液(pH 7.3)を用いた。また、両試験に用いた感作赤血球は、ヒツジ赤血球0.1 mlに1 mg/mlの弱アルカリ処理LPS(0.25 M水酸化ナトリウム、56℃、1時間)0.175 mlおよびバルビタール緩衝液0.75 mlを加え、37℃、30分間インキュベートした後、同緩衝液に懸濁して調製した。

PH試験は、以下の方法で行なった。100倍希釈血清の2倍希釈列0.2 mlに0.2 mlの0.5%感作赤血球浮遊液0.2 mlおよび20 μ lのモルモット補体(10倍希釈液、極東製薬工業)を加え37℃、30分インキュベートした。反応後、1 mlのバルビタール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して%溶血を求めた。溶血対照と非溶血対照にはそれぞれ抗血清の代わりに蒸留水とバルビタール緩衝液を用いた。血清の各希釈倍率に対する溶血曲線を作成し、50%溶血価を求めた。

PHI試験は、0.1 mlの抗血清に種々の濃度のインヒビターLPS溶液0.1 mlを

加え 37 °C、30分インキュベートした後、0.2 mlの 0.5 %感作赤血球浮遊液および 20 μ l のモルモット補体を加え、37°C、30 分間インキュベートした後、前述と同様に吸光度を測定した。抗血清は、100 % 溶血を示す最大希釈率のものを用いた。% 溶血阻止の値を算出し、インヒビターの濃度に対する溶血阻止曲線を作成して 50 % 溶血阻止濃度を求めた。対照として、抗血清を含まない補体対照とインヒビターを含まない溶血対照を用いた。使用した O 1 コレラ菌 O 抗原に対する A 因子血清は、国立予防衛生研究所、島田俊雄博士より分与された。A 因子血清は、抗イナバ型 O 1 コレラ菌抗血清を海水ビブリオ 1875 Variant で吸収して調製したもので、凝集価は 640倍であった。

第 2 章に関する実験

1. O 1 コレラ菌のオガワ特異構成糖の検出

O 1 コレラ菌 LPS のオガワ特異構成糖は、以下の方法で検出した。試料 1 mg を Redmond [9] の方法に従って、10 M 塩酸で 90°C、15 分加水分解後減圧下蒸発乾固し、その残渣を一般事項 4-2 アミノ糖の分析に示した方法で誘導体化した後、GLC および GC/MS によって分析した。

2. O 1 コレラ菌および 1875 LPS のオガワおよび Original 特異構成糖の N-acyl 基の検討

試料 2 mg を 0.5 ml の HF に溶解し一般事項 4-3 N-acyl 化 perosamine の分析に示した方法でソルボリシスした後誘導体化し、GLC および GC/MS によって分析した。

3. O 1 コレラ菌 LPS のオガワ特異構成糖および 1875 LPS の Original 特異構成糖の分離・精製

O 1 コレラ菌 LPS のオガワ特異構成糖および 1875 LPS の Original 特異構

成糖は、以下の方法で分離・精製した。オガワおよび 1875 Original PS 100mgを 10 ml の HF に溶解した後、0 °C、3 時間ソルボリシスした。反応液は、ドライアイス/アセトン (-75 °C) で冷却し、10 倍量の同様に冷却したエーテルを加えた後、30 gの炭酸カルシウムを加えて HF を中和した (室温)。糖質は、反応液を窒素気流下で蒸発乾固した後 20 mlの蒸留水で 3 回抽出した。抽出液は、濃縮後 Dowex 50 (H⁺) および Dowex 1 (CH₃COO⁻) を用いて脱塩した後凍結乾燥した。得られた糖質は、Sugar Pak-Pb (7.8 x 300 mm, Waters, USA) カラムを用いた HPLC によって分画・精製した。HPLC は、Shimadzu LC-6Aを使用し、検出器には示差屈折率計 (Shimadzu RID-6A) を使用した。溶出液には精製水を用い、0.5ml/分の流速で溶出した。得られた各画分は、ピリジン/無水酢酸 (1:1) で全アセチル化したのち GLC および GC/MS によって分析し、O1 コレラ菌 LPS のオガワ特異構成糖および 1875 LPS の Original 特異構成糖を得た (収率: オガワ、0.3 %:1875 Original、2.0 %)。

4. オガワおよび Original特異構成糖の D- および L- 立体配置の決定

オガワおよび 1875 Original PSから抽出精製した特異構成糖の D- および L- 立体配置は、Gerwig ら [58]の変法によって検討した。

特異構成糖 (100 μg)を Ciucanuと Kerek [59] の方法に従って全メチル化した。得られた全メチル化糖を 2 M塩酸・S-(+)- および R-(-)-2-butanolに溶解し、85°C、14時間処理し、Table 2Eに示したプログラム 1 の条件で GC/MSによって分析した。内部標準物質には、myo-inositolを用いた。

5. その他の実験

O1 コレラ菌オガワおよび 1875 Original LPS の特異構成糖の検出を目的としたメチル化分析は、重水素ラベルされたヨウ化メチル (CD₃I, Aldrich) を用いて、一般事項 5 メチル化分析に示した方法に準じて行なった。

引用文献

1. Aumann, P. & Schubert, R. H. W. (1984) in Bergey's manual of systematic bacteriology, (Krieg, N.R., ed.) vol. 1, pp.516-550, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. Finkelstein, R.A. (1973) *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 2, 553-623.
3. Sakazaki, R. & Donovan, T.J. (1984) in *Methods in microbiology* (Bergan, T., ed.) vol.16, pp.271-289, Academic Press, London.
4. Sakazaki, R. & Tamura, K. (1971) *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 24, 93-100.
5. Ramamurthy, T., Garg, S., Sharma, R., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., Shimada, T., Takeda, T., Karasawa, T., Kurazano, H., Pal, A. & Takeda, Y. (1993) *Lancet* 341, 703-704.
6. Albert, M. J., Siddipue, A. K., Islam, M. S., Faruque, A. S. G., Ansaruzzaman, M., Faruque, S.M. & Sack, R.B. (1993) *Lancet* 341, 704.
7. Shimada, T., Nair, G. B., Deb, B. C. Albert, M. J., Sack, R.B. & Takeda, Y. (1993) *Lancet* 341, 1347.
8. Willkinson, S.G. (1977) in *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell* (Sutherland, I.W., ed.) pp 97-175, Academic Press, London.
9. Redmond, J.W. (1975) *FEBS Lett.* 50, 147-149.
10. Kenne, L., Lindberg, B., Unger, P., Gustafsson, B. & Holme, T. (1982) *Carbohydr. Res.* 100, 341-349.
11. Hisatsune, K., Yamamoto, F. & Kondo, S. (1985) in *Advances in research on cholera and related diarrheas* (Kuwahara, S. & Pierce, N.F., ed.) pp 17-24, Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
12. 近藤誠一 (1990) *日本細菌学会誌* 45(6), 891-901.
13. Hisatsune, K., Hayashi, M., Haishima, Y. & Kondo, S. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135, 1901-1907.

14. Kaca, W., Brade, L., Rietschel, E.T. & Brade, H. (1986) *Carbohydr. Res.* 149, 293-298.
15. 久恒和仁、近藤誠一、徳永英治、今川義孝、村岡東洋治、大友信也 (1985) *日本細菌学会誌* 40, 191.
16. Tokunaga, E., Imagawa, Y., Kudoh, K., Muraoka, T., Ohtomo, N., Kondo, S. & Hisatsune, K. (1988) in *Advances in research on cholera and related diarrheas* (Kuwahara, S. & Pierce, N.F., ed.) pp215-223, Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
17. Shimada, T., Sakazaki, R. & Oue, M. (1987) *J. Appl. Bacteriol.* 62, 453-456.
18. Shimada, T., Sakazaki, R. & Tobita, K. (1987) *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 40, 153-157.
19. Shimada, T. & Sakazaki, R. (1988) *J. Appl. Bacteriol.* 64, 141-144.
20. Haishima, Y., Kondo, S. & Hisatsune, K. (1990) *Microbiol. Immunol.* 34, 1049-1054.
21. Kondo, S., Ishida, K., Isshiki, Y., Haishima, Y., Iguchi, T. & Hisatsune, K. (1993) *Biochem. J.* 292, 531-535.
22. McCullough, N.B., Eisele, W. & Beal, G.A. (1948) *J. Infect. Dis.* 83, 55-59.
23. Feely, J.C. (1969) *J. Bacteriol.* 99, 645-649.
24. Barua, D. & Watanabe, Y. (1972) *J. Hygg. (Camb.)* 70, 161-169.
25. Caroff, M., Bundle, D. R., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J.W. & Duncan, J.R. (1984) *Infect. Immun.* 46, 384-388.
26. Caroff, M., Bundle, D. R. & Perry, M.B. (1988) *Eur. J. Biochem.* 139, 195-200.
27. 葎島由二、近藤誠一、久恒和仁 (1989) 第 36 回毒素シンポジウム予稿集、pp 45-50.

28. Corbel, M.J. & Wray, C. (1975) *Br. Vet. J.* 131, 324-333.
29. Corbel, M.J. (1975) *J. Hyg. (Camb.)* 75, 151-171.
30. Corbel, M.J. (1979) *Contr. Microbiol. Immunol.* 5, 50-63.
31. Bundle, D. R., Gerken, M. & Perry, M.B. (1986) *Can.J. Chem.* 64, 255-264.
32. Perry, M.B. Bundle, D.R. MacLean, L., Perry, J.A. & Griffith, D. W. (1986) *Carbohydr. Res.* 156, 107-122.
33. Perry, M.B., MacLean, L. & Griffith, D.W. (1986) *Biochem. Cell Biol.* 64, 21-28.
34. Nobechi, K. (1923) *Sci. Rep. Gov. Inst. Infect. Dis. Tokyo Imp. Univ.* 2, 43-88.
35. Kauffmann, F. (1950) *Acta Pathol. Microbil. Scand.* 27, 283-299.
36. Lüderitz, O. (1967) *J. Bacteriol.* 93, 1681-1687.
37. Seid, R.C. & Sdoff, J.C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7305-7310.
38. Bock, K. & Pedersen, C. (1983) in *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (Tipson, R.S. & Horton, D., ed.) vol. 41, pp 27-66, Academic Press, New York.
39. Bock, K., Lundt, I. & Pedersen, C. (1980) *Tetrahedron Lett.* 13, 1037-1040.
40. Hisatsune, K., Kondo, S. & Kobayashi, K. (1978) *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 31, 181-184.
41. Kenne, L., Unger, P. & Wehler, T. (1988) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1183-1186.
42. Redmond, J.W. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* 542, 378-384.
43. Kabir, S. (1982) *Infect. Immun.* 38, 1263-1272.

44. Hisatsune, K. Kondo, S. (1980) *Biochem. J.* 185, 77-81.
45. Franzon, V.L. & Manning, P.A. (1986) *Infect. Immun.* 52, 279-284.
46. Ward, H. M., Morelli, G., Kamke, M., Morona, R., Yeadon, J., Hackett, J.A. & Manning, P.A. (1987) *Gene* 55, 197-204.
47. Ito, T., Ohshita, Y., Nakamoto, T., Hiramatsu, K. & Yokota, T. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 679-684.
48. Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W. & Perry, M.B. (1987) *Biochemistry* 26, 8717-8726.
49. Gupta, R.K., Szu, S.C., Finkelstein, R.A. & Robbins, J.B. (1992) *Infect. Immun.* 60, 3201-3208.
50. Westphal, O., Lüderitz, O. & Bister, R. (1952) *Z. Naturforsch.* 7b, 148-155.
51. Galanos, C., Rietschel, E.T., Lüderitz, O. & Westphal, O. (1971) *Eur. J. Biochem.* 19, 143-152.
52. Mawhinney, T., Feather, M., Martinetz, R.R. & Barbero, G.J. (1878). *Carbohydr. Res.* 75, C21-C23.
53. Mort, A.J. & Lampert, T.A. (1977) *Anal. Biochem.* 82, 289-309.
54. Osborn, M.J. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50, 499-506.
55. Weissbach, A. & Hurwitz, J. (1959). *J. Biol. Chem.* 234, 705-709.
56. Hakomori, S. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* 51, 205-208.
57. Shimada, T. & Sakazaki, R. (1973) *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 26, 155-160.
58. Gerwig, G. J., Kamerling, J. P. & Vliegenthart, J. F. G. (1978) *Carbohydr. Res.* 62, 349-357.
59. Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984) *Carbohydr. Res.* 131, 209-217.