

博士論文

論文題目 豚丹毒菌の感染経路と
組織親和性に関する研究

氏名 原田 知享

目次

緒論	1
第一章 豚丹毒菌の豚扁桃からの侵入	
序論	5
材料と方法	7
結果	9
考察	11
要約	14
図表	15
第二章 豚丹毒菌莢膜多糖のホスホリルコリンによる修飾と病原性への関与	
序論	20
材料と方法	22
結果	26
考察	29
要約	32
図表	33
第三章 豚丹毒菌莢膜 PCho 残基の血管内皮細胞への付着性	
序論	39
材料と方法	41

結果	44
考察	46
要約	49
図表	50

第四章 豚血管内皮細胞における豚丹毒菌 SpaA タンパク質に対する受容体の探索

序論	56
材料と方法	58
結果	61
考察	62
要約	64
図表	65
総括	69
謝辞	72
参考文献	73

緒論

豚丹毒菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* はグラム陽性、非抗酸性、非芽胞形成性の桿菌で、豚を筆頭にヒトを含む様々な哺乳類、鳥類に病原性を有している。豚丹毒は豚丹毒菌による豚の全身性感染症であり、その経済的被害の大きさ故に家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定されている。日本国内における豚丹毒の発生は、1960年代に年間数万頭に達し、1970年代に生ワクチンが普及してからは発生頭数は減少したものの、いまだ年間2,000頭前後の発生があり、その発生頭数は横ばいから増加傾向にある（図1）。

豚丹毒菌は世界中の土壌や水系、海水中など様々な環境中に分布している[1]。また、豚丹毒菌の宿主域は非常に広く、豚、牛、馬、羊、鶏、七面鳥などの家畜の他に、野生の哺乳類、鳥類、淡水魚、海水魚、昆虫類からも分離される[1]。豚丹毒菌の最大のレゼルボアは豚であり、健康豚の30～50%が扁桃などのリンパ組織に保菌し、糞便、唾液、鼻汁中に菌を排出している[1,2]。養豚場では持続感染豚から排出された菌が飼育環境中を汚染し、それが感染源となって豚丹毒が発生すると考えられている。

豚丹毒菌の豚への感染経路には創傷感染および経口感染がある[1,3]。汚染された環境からの創傷感染は感染経路の一つと考えられるが、豚丹毒発症豚は必ずしも皮膚に外傷があるわけではないため、汚染された餌や水からの経口感染が最も一般的な感染経路と考えられている。しかし、豚丹毒菌が豚の消化管のどの部位から体内に侵入しているのか、また、正常な粘膜から侵入可能であるかなど未だ不明な点が多い。豚丹毒菌は扁桃に常在する傾向にあり、また、経口感染実験では扁桃や粘膜関連リンパ組織で菌が感染早期から検出される[4]ことから、これらの部位が侵入門戸となることが予想されている。

豚丹毒菌は株間で大きく病原性が異なることが知られている。しかし、豚丹毒菌の病原性発現機構はほとんどわかっておらず、また、豚丹毒菌が産生する毒素もみつかっていない。これまでにみつかった病原因子のうちノイラミニダーゼ、莢膜および表層

タンパク質が重要と考えられている[1,5]。豚丹毒菌の菌体外酵素であるノイラミニダーゼは細胞への付着、侵入に関与することが知られており、豚丹毒菌株間のノイラミニダーゼ産生量と病原性とが相関している[6,7]。また、莢膜の存在は食細胞内での生残性と関係している[8]。さらに、菌体表層タンパク質である RspA および RspB は付着因子として働き、フィブロネクチンやコラーゲン type I、IV といった細胞外基質に付着することが報告されている[9]。

豚丹毒の病態は多彩で、臨床的には急性型、亜急性型、慢性型に分類される[1]。急性型豚丹毒では敗血症による発熱、横臥、突然死がおこる。亜急性型では急性型より軽度な全身症状がみられるが、中でも特徴的なのは皮膚の菱形紅斑である。慢性型では多発性関節炎や疣贅性心内膜炎がみられるが、死亡率は低く食肉衛生検査時に偶然発見されることも多い。急性型豚丹毒の死亡豚では、全身性のうっ血、四肢の浮腫がみとめられ、また、脾腫やリンパ節の腫大、心外膜・消化管漿膜・腎臓の点状～斑状出血が散見される。組織学的には全身の中～小血管の病変が顕著である。腎糸球体では硝子血栓や菌塞栓が頻発し、小動脈や小静脈では血栓形成、菌塞栓、血管周囲の単核球浸潤が好発する。これらの血管病変は皮膚、心臓、肺、肝臓、中枢神経系、骨格筋など多臓器でみとめられ、それに伴う出血や梗塞巣も散見される。菌体は血管内やその周囲組織中にみとめられ、また、しばしば血中のマクロファージ内にも観察される。このように、急性型豚丹毒は血管病変が特徴的である。そのため、豚丹毒菌の血管親和性は病原性の発現機序を考える上で重要な因子となる。

これらの背景をふまえ、本研究では豚丹毒菌の体内への侵入機序と血管親和性に関わる分子機序を明らかにし、豚丹毒の病態への理解を深めることを目的とした。本論文は四章から構成される。第一章では、無菌豚への豚丹毒菌経口感染実験で得られた扁桃組織を病理組織学的に解析し、豚丹毒菌が豚扁桃組織から侵入する機序を考察した。第二章では豚丹毒菌の新たな病原因子として豚丹毒菌莢膜多糖を修飾するホスホリルコリン

(PCho) に着目し、その生化学的性状の解析と PCho 欠損変異株の作製、病原性試験を行った。第三章では、莢膜多糖 PCho 残基と豚丹毒菌の血管親和性との関連を明らかにするため、豚血管内皮細胞を用いて PCho 欠損変異株の付着試験を行い、豚丹毒菌が血管内皮細胞に付着する分子メカニズムを検討した。第四章では、第三章で豚血管内皮細胞への付着に関与することが明らかとなった SpaA タンパク質について、それに結合する血管内皮細胞の受容体を探索した。

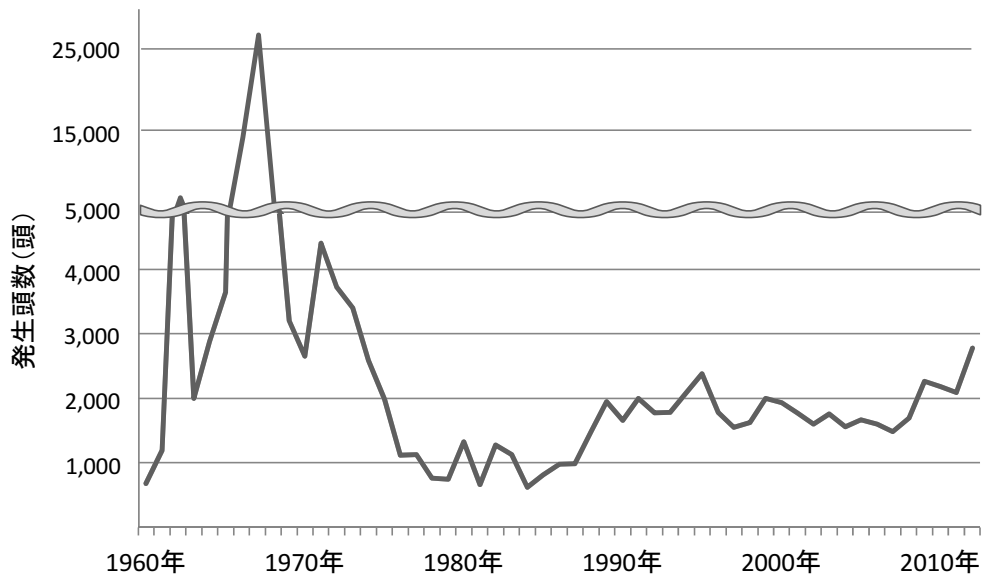


図1. わが国の豚丹毒の発生状況（2012年度監視伝染病発生年報より作成）

第一章

豚丹毒菌の豚扁桃からの侵入

序論

扁桃は口咽頭粘膜に存在する粘膜関連リンパ組織 (MALT) の一種である。口腔や鼻腔から侵入した異物や病原体を認識する最初の免疫器官として、粘膜免疫において重要な役割を担っている。豚には 5 種類の扁桃が左右一対ずつ存在し、中でも軟口蓋に存在する口蓋帆扁桃が最もよく発達する[10]。口蓋帆扁桃は多数の陰窩を有しており、その周囲をリンパ濾胞が取り囲む。扁桃陰窩を覆う重層扁平上皮は、口腔の上皮とは異なり、上皮内リンパ球や樹状細胞などを多数含んでおりリンパ上皮と呼ばれている[10]。

豚の扁桃には多数の常在菌が存在しており、また、*Salmonella*、*Actinobacillus pleuropneumoniae*、*Actinobacillus suis*、*Haemophilus parasuis*、*Streptococcus suis* など、さまざまな病原細菌も扁桃に定着しうる[11-15]。豚丹毒菌についても、健康豚の 30～50%が扁桃に保菌していると報告されており[1,2,16]、扁桃は病原細菌の一次増殖や持続感染の場として利用されている。

一般的に粘膜上皮は病原体に対しバリアとして働くが、一部の病原細菌にとって粘膜は体内の侵入経路でもある。腸管粘膜からの細菌の侵入について多くの研究があり、MALT の一種である回腸パイエル板に存在する M 細胞が、*Salmonella Typhi*、*Salmonella Typhimurium*、*Vibrio cholerae*、*Yersinia enterocolitica*、*Campylobacter jejuni* など多くの消化管感染症原因菌の侵入門戸として利用されている[17-21]。一方、扁桃からの病原細菌の侵入機構はよくわかっていない。豚丹毒菌が経口感染すると、扁桃に菌が感染早期から検出されることから[4]、扁桃は侵入門戸のひとつであると予想される。

本章では、豚丹毒菌を経口感染させた無菌豚の扁桃組織を病理組織学的に解析し、扁桃での定着および組織への侵入機構に関して考察した。

材料および方法

1. 動物および感染実験

子宮摘出法により作出した無菌豚（大ヨークシャー種）2頭を用いた。無菌豚は陽圧アイソレーター内で、無菌代替乳（SPF-LAC; Weyerhaeuse, Eaton, OH, USA）を用いて飼育した。国内で使用されている豚丹毒菌生ワクチン株である小金井 65-0.15 株を、brain heart infusion（Becton, Dickinson and Company, MD, USA）に 0.1% Tween 80 を添加した培地（BHI-T80）で培養し、感染実験に使用した。10 日齢の子豚 2 頭それぞれに 4.2×10^7 cfu の豚丹毒菌を経口的に混餌投与し、投与 4 週後に安楽殺した。口蓋帆扁桃、肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓、腸管および下顎リンパ節を採材し、組織学的検索に用いた。また、口蓋扁桃、血液および肘、膝関節液に関して、BHI-T80 寒天培地を用いて生菌数を計測した。動物実験は動物衛生研究所動物実験倫理委員会の承認を受け、同所動物実験要領に従い実施した。

2. 病理組織学的検索

採材した組織は 10% 中性緩衝ホルマリンで一晩固定後、定法通りパラフィン包埋し、厚さ 2 μm の組織切片を作製した。切片についてヘマトキシリン&エオジン（HE）染色、グラム染色（Hucker-Conn 法; 武藤化学株式会社、東京）および免疫組織化学を行った。免疫組織化学には一次抗体として、抗 Cytokeratin (CK)18 モノクローナル抗体 (clone CY-90; Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)、抗 CK 5/6 モノクローナル抗体 (clone D5/16 B4; DAKO-Japan、京都) およびホルマリン殺菌豚丹毒菌体で免疫した家兎血清を用いた。10 mM Tris-EDTA 緩衝液 pH 9.0 (CK 18 および CK 5/6) もしくは 10 mM クエン酸緩衝液 pH 6.0 (抗豚丹毒菌家兎血清) 中で 120°C、10 分間のオートクレーブにより抗原賦活し、1% 過酸化水素加メタノール（室温、30 分）による内因性ペルオキシダーゼの不活化、5%

スキムミルクによるブロッキングを行った。一次抗体と 37°C、60 分間反応させた後、二次抗体として Envision polymer reagent (DAKO-Japan) と 37°C、60 分間反応させ、その後、3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液により反応産物を可視化し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

3. 免疫蛍光二重染色

採材した扁桃組織から 15 μ m 厚の未固定凍結切片を作製した。4%パラホルムアルデヒドで 4°C、20 分間固定し、5% スキムミルクでブロッキングを行った。一次抗体として抗 CK 18 モノクローナル抗体および抗豚丹毒菌家兎血清を、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG および Alexa Fluor® 546 標識抗ウサギ IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) をそれぞれ 37°C 60 分間反応させた。染色した標本は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5 ; Leica Microsystems、東京) を用いて観察した。

4. 透過型電子顕微鏡観察

採材した扁桃組織を 2 mm³ 大に細切し、リン酸緩衝した 2%グルタルアルデヒドと 2%パラホルムアルデヒド混合液、続いて 1%四酸化オスミウム溶液で、それぞれ 4°C、2 時間固定した。その後、エタノール系列で脱水、QY-1 (日新 EM、東京) で透徹し、樹脂 (Quetol651 ; 日新 EM) に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (H-7500 ; 日立ハイテク、東京) で観察した。

結果

1. 豚丹毒菌の定着

豚丹毒菌小金井 65-0.15 株を経口感染させた無菌子豚 2 頭に、感染期間 4 週間を通じて臨床症状はみとめられず、解剖時においても明らかな肉眼病変はみられなかった。豚丹毒菌の全身への移行を調べるため、口蓋帆扁桃、血液および関節液からの菌分離を行った。その結果、多数の菌が口蓋帆扁桃から分離され、また、血液および関節液からも少数の菌が分離された（表 1-1）。

2. 病理組織学的所見

豚丹毒菌感染豚の病理組織学的所見は 2 頭とも同様であり、口蓋帆扁桃以外の諸臓器に著変はみとめられなかった。口蓋帆扁桃では、一部の陰窩が拡張し、陰窩腔に食渣や細胞退廃物が充満していた（図 1-1A、B）。グラム染色では陰窩腔に多数のグラム陽性桿菌が観察され、一部の菌体は陰窩の上皮様細胞内や陰窩周囲の食細胞内に観察された（図 1C、D）。抗豚丹毒菌血清を用いた免疫組織化学では、グラム染色の所見と同様に陰窩腔に多数の陽性反応がみられ、一部の陰窩上皮様細胞内および食細胞内にも陽性反応がみとめられた（図 1E、F）。

口蓋帆扁桃表層の上皮は咽頭の上皮と同様、非角化重層扁平上皮である。一方、扁桃陰窩を覆う上皮は非角化ないし一部角化した重層扁平上皮であり、多数の上皮内リンパ球や樹状細胞が存在している[10]。重層扁平上皮に特異的な CK 5/6 タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学解析の結果、扁桃表層上皮および陰窩上皮はどちらも陽性であった（図 1-2A、B）。一方、腺上皮や豚の腸管 M 細胞マーカーとして用いられている CK 18 タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学解析の結果、扁桃表層上皮には CK 18 陽性細胞は観察されず、陰窩上皮にのみ陽性細胞が散見され

た (図 1-2C、D)。陰窩上皮の CK 18 陽性細胞は類円形、円柱形～網状と多様な形態を呈し、基底側～表層に散見された。一部の CK 18 陽性細胞にはリンパ球が侵入していた (図 1-2D)。

3. 蛍光二重染色

HE 染色で観察された上皮様細胞への豚丹毒菌の侵入を、蛍光二重染色を用いてより詳細に解析した結果、菌体抗原が陰窩腔に面した一部の CK 18 陽性上皮細胞内にみとめられた (図 1-3)。CK 18 陰性の上皮細胞内に豚丹毒菌抗原は確認されなかった。

4. 透過型電子顕微鏡観察

陰窩腔には多数の菌体が観察され、一部の陰窩表層の上皮細胞内にも菌体が確認された (図 1-4A)。また、菌体を含む上皮細胞に食細胞が侵入する像も観察された (図 1-4A)。上皮細胞内で、菌体は電子密度の高い一重膜の膜構造物内にみとめられた (図 1-4B)。菌体を含む上皮細胞は、周囲の上皮細胞とデスモゾーム構造で接着しており (図 1-4C)、周囲の扁平上皮細胞と比較するとトノフィラメントに乏しく、細胞表層に微絨毛や microfold はみとめなかった。

考察

豚丹毒菌は健康豚の扁桃や他のリンパ組織に定着し持続感染することが知られており[1,2]、また、扁桃は豚丹毒菌の体内への侵入門戸のひとつと考えられている[1]。本章では、国内で使用されている生ワクチン株である豚丹毒菌小金井 65-0.15 株を無菌子豚に経口感染させ、その扁桃組織を組織学的に観察した。その結果、少なくとも接種後 4 週の間、口蓋帆扁桃組織において豚丹毒菌の持続的な感染が確認された。多くの菌は扁桃陰窩腔に存在し、一部の菌は上皮細胞間や陰窩上皮細胞内、食細胞内にも観察された。これらの所見から、豚丹毒菌は扁桃陰窩腔内で増殖、定着し、陰窩上皮を通過して組織内へ侵入することが示唆された。

豚口蓋帆扁桃の陰窩上皮は非角化重層扁平上皮であるが、その中に CK 18 陽性の上皮細胞が混在することがわかった。同細胞は扁桃陰窩上皮に特徴的であり、口咽頭の上皮には存在しない。また、この CK 18 陽性細胞は無菌豚だけでなく、コンベンショナル豚でも同様に観察された。さらに、蛍光二重染色により、CK 18 陽性上皮細胞に豚丹毒菌が侵入している像が観察され、CK 18 陰性上皮細胞内には豚丹毒菌抗原はみとめられなかった。これらのことから、CK 18 陽性上皮細胞は豚丹毒菌の扁桃陰窩における主要な侵入門戸であることが示唆された。

CK 18 タンパク質は豚の回腸パイエル板における M 細胞のマーカーとして利用されている[22]。M 細胞は回腸パイエル板に存在する特殊な上皮細胞で、腸管腔から様々な抗原を取り込む機能がある[23,24]。取り込まれた抗原は上皮直下に存在する樹状細胞やリンパ球に認識され、パイエル板において免疫応答が惹起される。一方で、M 細胞は様々な病原体の侵入門戸ともなっている[25,26]。M 細胞は腸管腔側の細胞表面に丈の低い微絨毛や microfold と呼ばれるひだ状構造をもち、また基底側では cytoplasmic pocket と呼ばれる嚢状に陥入した構造を有し、その中に樹状細胞やリンパ球を容れる。パイエル板以外の粘膜

関連リンパ組織にも、その形態的特徴から、粘膜上皮内における M 細胞の存在が示唆されている[27]。扁桃の M 細胞についてはブタ、ウサギ、ウマ、ヒトにおいて報告がある[27-30]。Belz と Heath の論文[28]では、豚の口蓋帆扁桃の陰窩上皮では、非角化扁平上皮細胞、杯細胞、M 細胞が混在し、また、M 細胞はパイエル板のものと同様の形態学的特徴を有すると記述されている。しかし、パイエル板以外の M 細胞の抗原取り込み能や、同細胞を介する病原体の侵入に関しては未だ不明な点が多い[27]。

本章の研究で確認された扁桃陰窩の CK 18 陽性上皮細胞には必ずしも上皮内リンパ球の侵入がみとめられず、また、超微形態的に菌を細胞質に含む上皮細胞表面に微絨毛や microfold の構造もみとめられなかった。ヒトの口蓋扁桃において、CK 18 が陰窩の reticulated epithelial cell に発現し、また形態的特徴から CK 18 は M 細胞の特異マーカーではないという報告がある[31]。パイエル板 M 細胞のマーカーは動物種ごとに異なり、豚では CK 18 が、マウスではレクチンの *Ulex europaeus agglutinin-1* (UEA-1) が、ウサギでは vimentin が主に用いられてきた[22,32,33]。しかし、それらの特異性は低く、パイエル板以外の M 細胞の染色性については不明である。最近、マウスおよびヒトの M 細胞特異マーカーとして GP2 が報告された[34]。しかし、本研究で GP2 に対する抗体 (clone 2F11-C3; MBL, 名古屋) を用いて豚回腸および扁桃組織を免疫染色したが、豚組織との交差反応はみられなかった。したがって、本章の研究で確認された扁桃陰窩の CK 18 陽性上皮細胞や電子顕微鏡観察で菌を含む上皮細胞は、豚の扁桃における M 細胞だとは断定できない。このため、CK 18 陽性細胞の抗原取り込み能の確認や、より特異的な豚の M 細胞マーカー分子の発見が必要である。

扁桃陰窩周囲には豚丹毒菌を貪食した多数のマクロファージが観察された。また、超微形態観察では、豚丹毒菌を細胞質に含む上皮細胞にマクロファージが侵入し、偽足を伸ばしている像が観察された。これらの所見は、扁桃陰窩上皮組織に常在する樹状細胞やマクロファージが、CK 18 陽性上皮細胞を通過した豚丹毒菌を直接受け取ることを示唆す

る。透過型電子顕微鏡観察で、食細胞中の豚丹毒菌はその形態を維持した状態で観察されたことから、食細胞内で生存していると考えられた。また、豚丹毒菌は活性酸素種から身を守ることで、食細胞中で生存、増殖することが可能であると報告されている[35]。これらのことは、扁桃陰窩から侵入した豚丹毒菌は食細胞に貪食されたのち、生きたまま所属リンパ節や全身循環に移行可能であることを示唆する。その結果、扁桃に豚丹毒菌を保菌した健康豚では、一部の菌は血中や末梢リンパ組織等に潜伏しており、宿主の免疫状態の悪化に伴い豚丹毒の発症につながることを予想される。

以上の結果から、経口的に感染した豚丹毒菌は豚の口蓋帆扁桃の陰窩内に定着すること、および扁桃陰窩の CK 18 陽性上皮細胞が豚丹毒菌の組織への侵入門戸であることが明らかとなった。豚丹毒菌以外の豚の病原細菌も、扁桃を持続感染の場や組織への侵入門戸としている[26]。他の病原体も同様に CK 18 陽性上皮細胞を侵入に利用していることが考えられるため、本研究の結果は、豚丹毒だけでなく様々な感染症の発症機構の解明に役立つものと思われる。今後、豚丹毒菌の粘膜からの侵入及び感染成立機構のさらなる理解のためには、豚丹毒菌による CK 18 陽性上皮細胞の認識機構、特に、豚丹毒菌の菌体表層抗原と細胞側レセプターとの相互作用を分子レベルで明らかにする必要がある。

要約

扁桃は口腔粘膜に存在する粘膜関連リンパ組織であり、様々な病原体の定着や侵入門戸となっている。豚丹毒菌は健康豚の扁桃に常在する傾向があり、また、扁桃を組織への侵入門戸として利用すると予想されている。本章では、豚丹毒菌を経口感染させた無菌子豚の扁桃組織を病理組織学的に解析し、豚丹毒菌の扁桃での定着および組織への侵入機構に関して考察した。10日齢の無菌子豚に豚丹毒菌小金井 65-0.15 株を経口投与し、4週間後、口蓋扁桃および主要臓器を採材した。扁桃組織から多数の菌が、血液や関節液からも少数の菌が分離されたことから、豚丹毒菌は扁桃に定着し、一部の菌は全身に移行することが明らかとなった。組織学的には、扁桃陰窩腔に多数の菌が観察され、一部の菌は陰窩上皮内や実質のマクロファージ内に散見された。豚のパイエル板 M 細胞のマーカーである Cytokeratin (CK) 18 に対する免疫組織化学の結果、扁桃陰窩上皮には CK 18 陽性細胞が散在することがわかった。さらに、二重蛍光染色の結果から CK 18 陽性細胞内に豚丹毒菌抗原が確認された。透過型電子顕微鏡観察では、菌体を細胞質に含む上皮細胞と、菌を受け取るマクロファージが観察されたが、同上皮細胞には微絨毛や microfold などの M 細胞の特徴はみとめられなかった。これらの結果から、扁桃陰窩腔が豚丹毒菌の持続感染の場であり、扁桃陰窩上皮に存在する CK 18 陽性細胞が豚丹毒菌の侵入門戸であることが明らかとなった。

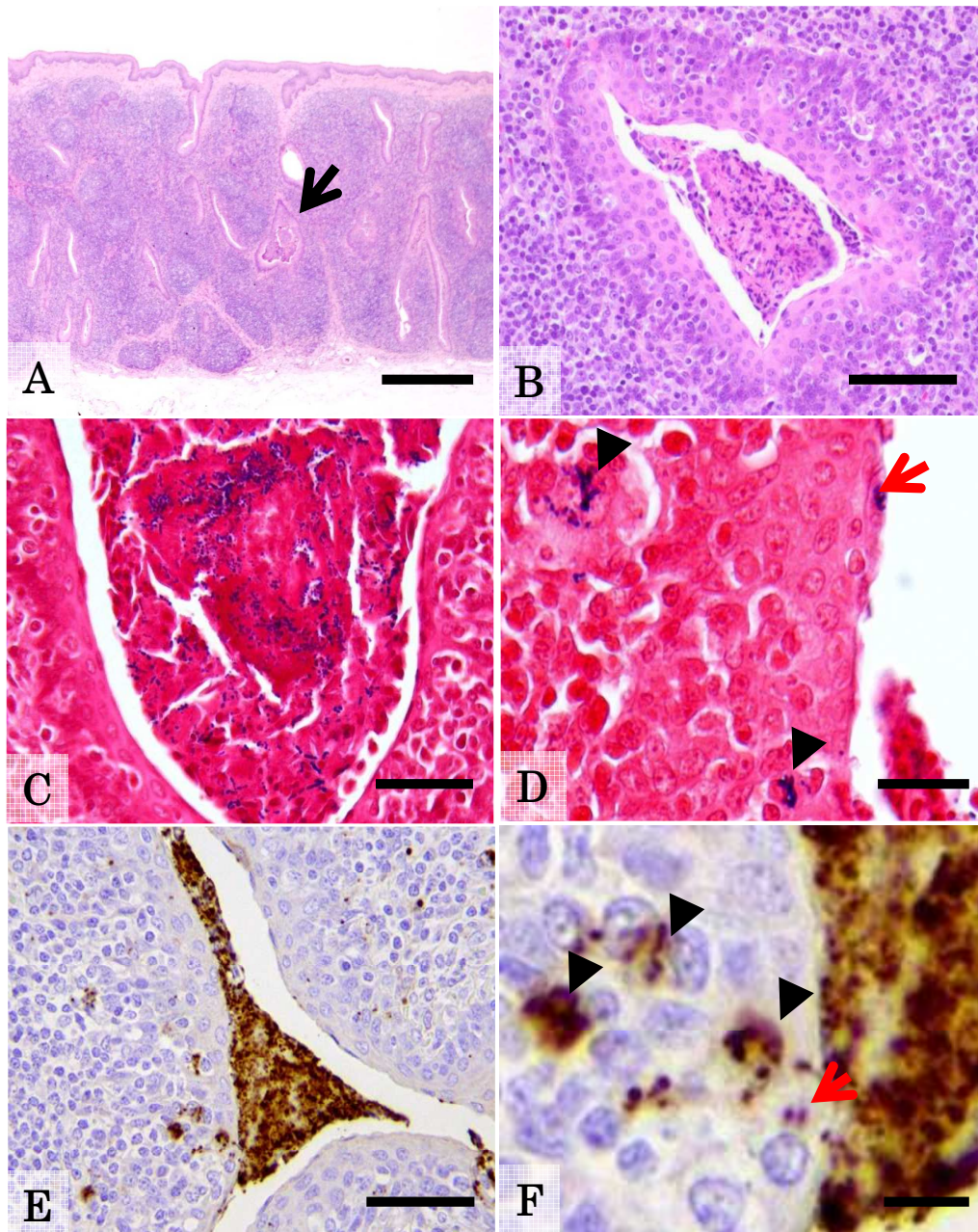


図1-1. 豚丹毒菌経口感染無菌子豚の口蓋帆扁桃組織

(A) 拡張した陰窩 (矢印)。HE染色。Scale bar=500 μm 。(B)細胞退廃物で満たされた陰窩。HE染色。Scale bar=100 μm 。(C) 陰窩。グラム染色。Scale bar=40 μm 。(D) グラム陽性桿菌が食細胞内 (矢頭)、上皮様細胞内 (赤矢印) にみとめられる。グラム染色。Scale bar=20 μm 。(E) 抗豚丹毒菌家兔血清を用いた免疫染色。Scale bar=100 μm 。(F) 豚丹毒菌抗原が食細胞内 (矢頭)、上皮様細胞内 (赤矢印) にみとめられる。抗豚丹毒菌家兔血清を用いた免疫染色。Scale bar=10 μm 。

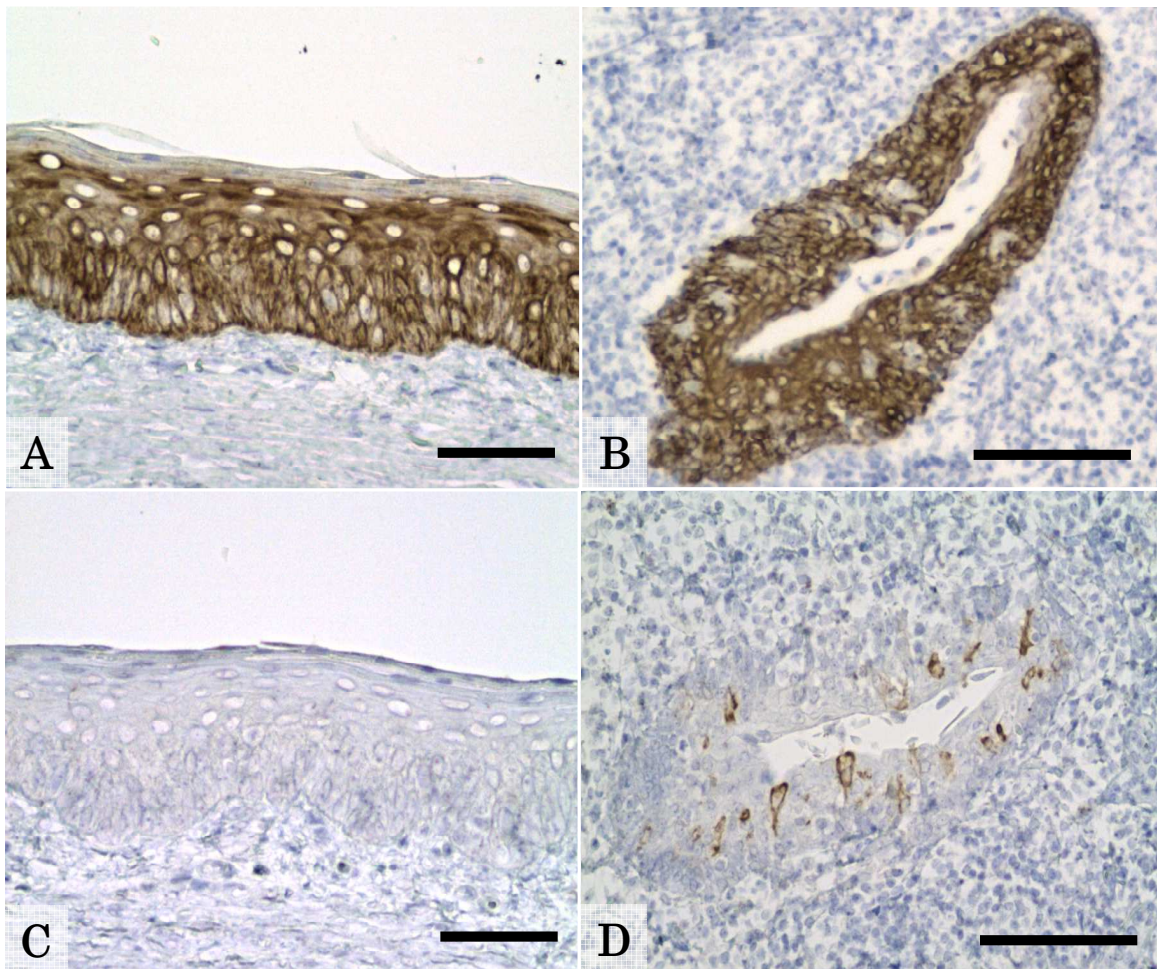


図1-2. 口蓋帆扁桃表層上皮および陰窩上皮の抗サイトケラチン抗体を用いた免疫染色
 (A) 扁桃表層上皮。抗CK 5/6抗体を用いた免疫染色。Scale bar=100 μ m。
 (B) 扁桃陰窩上皮。抗CK 5/6抗体を用いた免疫染色。Scale bar=100 μ m。
 (C) 扁桃表層上皮。抗CK 18抗体を用いた免疫染色。Scale bar=100 μ m。
 (D) 扁桃陰窩上皮。抗CK 18抗体を用いた免疫染色。Scale bar=100 μ m。

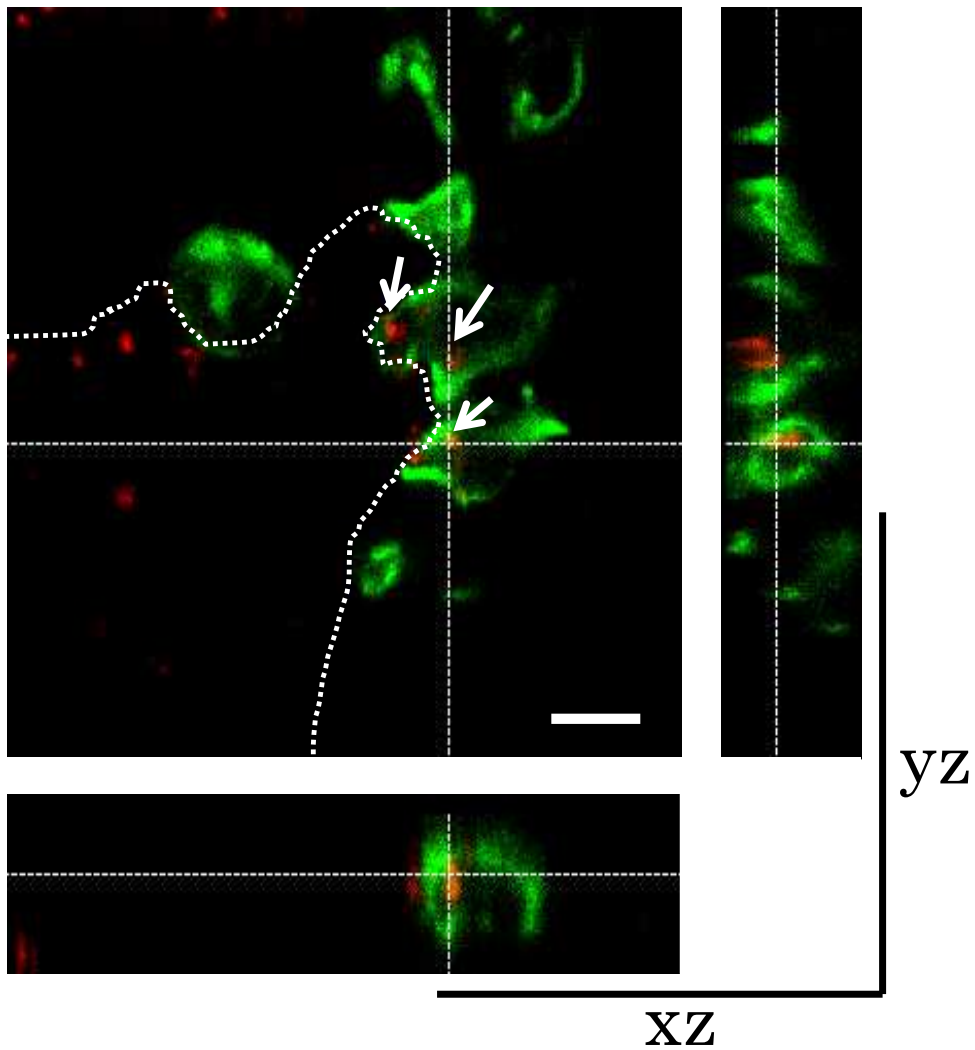


図1-3. 抗CK18抗体（緑）および抗豚丹毒菌家兎血清（赤）を用いた免疫蛍光二重染色Zスタック像。豚丹毒菌抗原（赤、矢印）がCK18陽性細胞（緑）内にみとめられる。細い点線：直交する平面が対応する位置。太い点線：陰窩腔と上皮との境界。Scale bar=10 μ m。

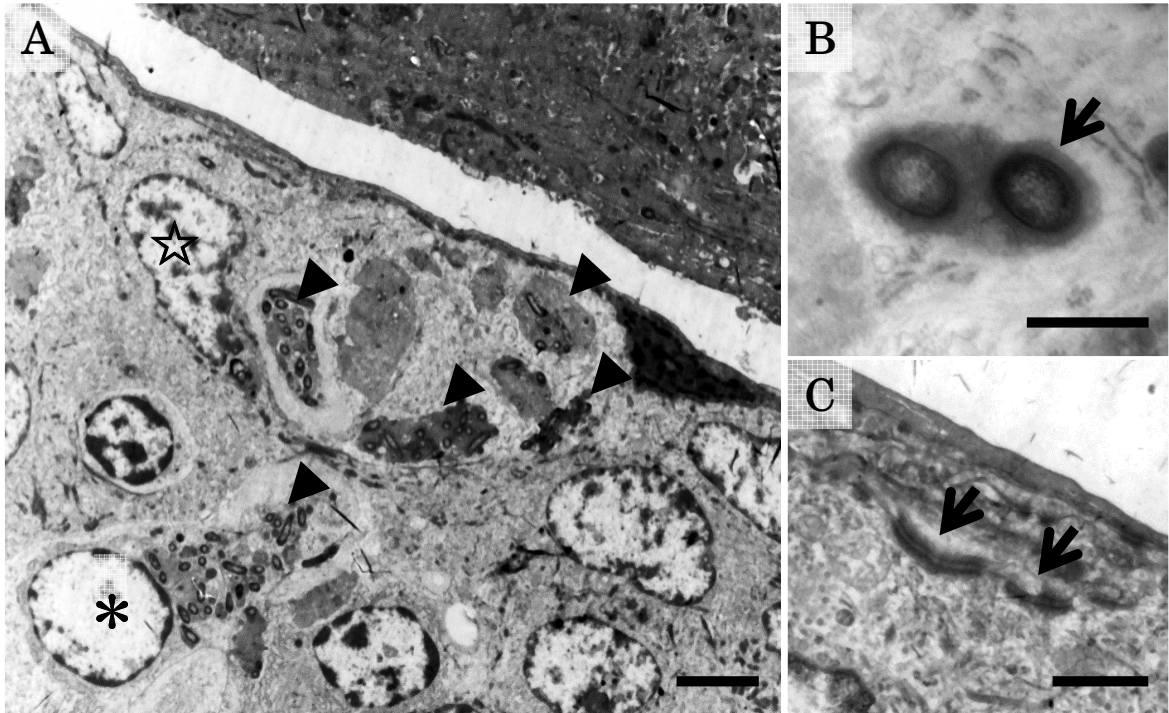


図1-4. 豚丹毒菌感染無菌子豚の扁桃上皮の超微形態像

(A) 菌体 (矢頭) が上皮様細胞 (☆) 内と食細胞 (*) にみとめられる。Scale bar=5 μ m。
 (B) 細胞内の菌体を包む一重膜構造 (矢印)。Scale bar=500 nm。 (C) デスモゾーム構造 (矢印)。Scale bar=1 μ m。

	分離菌数 (log ₁₀ cfu)	
	豚 No.1	豚 No.2
口蓋扁桃	7.69	7.82
血液	2.04	1.60
肘関節液	不検出	1.00
膝関節液	1.60	不検出

表1-1. 豚丹毒菌実験感染子豚からの分離菌数

第二章

豚丹毒菌莢膜多糖のホスホリルコリンによる修飾と病原性への関与

序論

病原体の菌体表層構造物は様々な修飾を受けており、宿主免疫系からの回避や組織への付着・定着など、感染の成立に極めて重要な役割を果たす。*Streptococcus pneumoniae*、*Haemophilus influenzae*、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Histophilus somni*など多くの粘膜病原菌では、ホスホリルコリン（PCho）が菌体表層を修飾しており、呼吸器や消化管などの粘膜への定着に利用されている[36-39]。PChoによる菌体表層の修飾は、*H. influenzae*および*S. pneumoniae*で詳細に解析されており、*H. influenzae*ではLPSが、*S. pneumoniae*では細胞壁を構成するリポテイコ酸およびテイコ酸がPChoにより修飾されており、宿主細胞への付着や侵入に関与している[37,40-42]。

種々の病原菌において、表層構造物のPChoによる修飾には*lic*遺伝子群が関与している。*H. influenzae*ではタンデムに配列した*licA*、*licB*、*licC*、*licD*の4個の遺伝子がオペロンを形成し、それぞれコリンの取り込みや転移、リン酸化に関与するタンパク質をコードしている[37]。一方*S. pneumoniae*では、*lic*遺伝子群の間にテイコ酸合成に関わる3個の遺伝子（*tarJ*、*tarI*、*tacF*）がはさまれており、*lic1*オペロン（*tarI*、*tarJ*、*licA*、*licB*、*licC*）と*lic2*オペロン（*tacF*、*licD1*、*licD2*）の二つのオペロンが存在する[43]。これらオペロンから翻訳された遺伝子産物により、テイコ酸合成とテイコ酸へのPCho残基の付与が一連の合成経路として働いている[42,44,45]。

豚丹毒菌藤沢株のゲノム解析から、豚丹毒菌にも*lic*遺伝子が存在し、クラスター

を形成していることがわかった[46]。さらに、この *lic* 遺伝子群は莢膜多糖合成に関連する遺伝子群 (*cps* 遺伝子群) の直下流にタンデムに存在していた。これらのことから、豚丹毒菌の菌体表層に PCho が存在し、その生合成と莢膜多糖の生合成が関連すると予想された。

莢膜は多くの病原細菌が有する病原因子であり、食細胞による貪食や補体の結合など、宿主の防御機構を回避する役割を担っている。豚丹毒菌は多糖より構成される莢膜を有しており、また、*cps* 遺伝子領域へのトランスポゾン挿入により作製された豚丹毒菌莢膜欠損変異株では病原性が大きく低下する[8]。さらに、同変異株では多形核白血球による貪食が亢進することも報告されている[8]。したがって、豚丹毒菌においても莢膜は重要な病原因子であると考えられる。

本章では、豚丹毒菌における PCho の存在とその莢膜多糖修飾を明らかにするため、豚丹毒菌藤沢株の莢膜多糖について、遺伝学的、生化学的解析を行った。また、豚丹毒菌の PCho の病原性への関与を調べるため、トランスポゾン挿入による PCho 欠損変異株を作製し、その生化学的解析および *in vivo* での病原性の評価を行った。

材料と方法

1. RT-PCR

藤沢株の全 RNA を RNeasy minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて抽出した。抽出した RNA は DNase I (RNase-free ; TaKaRa, 滋賀) を用いて DNA 夾雑物を除去し、Verso reverse transcriptase (Verso cDNA synthesis kit ; ABgene, Epsom, UK) を用いて cDNA への逆転写を行った。表 2-1 に示すプライマーを用いて cDNA を増幅し、アガロースゲル電気泳動で分離した。それぞれ、逆転写していない RNA を陰性コントロールとして用い、ゲノム DNA の混入がないことを確認した。

2. モノクローナル抗体

豚丹毒菌の莢膜抗原を認識するモノクローナル抗体 clone ER21 [47]および PCho 残基を認識するモノクローナル抗体 clone TEPC-15 (Sigma-Aldrich) を用いた。

3. 莢膜多糖の抽出、精製

ブタの敗血症症例から分離された豚丹毒菌野生株である藤沢株 (血清型 1a) [8]から莢膜多糖を精製した。藤沢株は 37°C で BHI-T80 培地で培養し、対数増殖期の菌を遠心分離により回収した。65°C の熱水に懸濁し、20 分間攪拌しながら粗莢膜多糖を抽出した。抽出液は DNase (116 U/ml ; Invitrogen)、RNase (500 g/ml ; Invitrogen) pronase (1 mg/ml ; Roche, Mannheim, Germany)、N-acetylmuramidase SG (66 U/ml ; 生化学工業株式会社、東京) で処理し、トリクロロ酢酸沈殿を行った。さらに、限外濾過により濃縮後、メタノール・クロロホルム抽出により脂質成分を除去し、50 mM NaCl を加えた 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で透析 (セルロース膜 ; カットオフ分子量=14,000) した。次に、陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (DE-52 ; Whatman, United Kingdom) を用い、50 mM

から 500 mM NaCl 加 Tris-HCl (pH 7.5) で分画溶出した。各分画はフェノール硫酸法で総糖質量を測定し、ER21 を用いてドットプロット法により莢膜多糖の存在を確認した。さらに、莢膜多糖を含む分画について、ゲル濾過クロマトグラフィーカラム (Sephacryl S-200 ; GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Sweden) を用い、150 mM NaCl 加 Tris-HCl (pH 7.5) で分画溶出し、総糖質量の測定と、ER21 を用いたドットプロット解析を行った。

4. 莢膜多糖の酸化処理

文献の方法[48]を用いて、莢膜多糖を過ヨウ素酸により酸化した。ゲル濾過クロマトグラフィーで分画抽出した各フラクションの莢膜多糖 400 ng を真空中で乾燥し、10 μ l の 20 mM 過ヨウ素酸を加えた 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) で再懸濁した。暗所で軽く振とうしながら、1 時間室温でインキュベートした。溶媒のみで処理した莢膜多糖を陰性コントロールとした。

5. 莢膜多糖のホスホリパーゼ C 処理

文献の方法[49]を一部変更し、莢膜多糖をホスホリパーゼ C (PLC) 処理した。莢膜多糖 (168 ng) を真空中で乾燥し、0.5% デオキシコール酸 (pH 8.0) に再懸濁し、これに PLC (1 U ; Sigma-Aldrich) を 0.1% 牛血清アルブミン加 10 mM 3,3-ジメチルグルタル酸-水酸化ナトリウムに溶解した液を添加した。37°C で 30 分間インキュベートし、0.2% SDS 加 1 M Tris-HCl を加え、反応を停止させた。溶媒のみで処理した莢膜多糖を陰性コントロールとした。

6. ドットプロット法およびウエスタンブロット法

ドットプロット法では莢膜多糖溶液をナイロン膜 (MagnaGraph ; Funakoshi, 東京) 上にスポットした。ウエスタンブロット法では、莢膜多糖溶液をドデシル硫酸ナト

リウムポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) により展開し、PVDF 膜 (Immobilon-P ; Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した。ナイロン膜および PVDF 膜は 1%スキムミルク-0.05% Tween20 加 PBS でブロッキングし、一次抗体として ER21 もしくは TEPC-15 を、二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG + IgM + IgA 重鎖抗体 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) をそれぞれ室温で 60 分間反応させた。洗浄後、DAB 溶液により反応産物を可視化した。

7. トランスポゾン挿入変異株の作製

トランスポゾン挿入変異株の作製には pMC30 [50]を用いた。藤沢株に pMC30 を電気穿孔法で導入後、1 µg/ml エリスロマイシン加 BHI-T80 寒天培地で 28°C で培養し、プラスミドを保持した菌を選択した。生えたコロニーを継代し、1 µg/ml エリスロマイシン加 BHI-T80 寒天培地で 40°C で培養し、トランスポゾンがゲノムに転移挿入された菌を選択した。生えた各コロニーに対して、表 2-2 に示したプライマーを用いて Arbitrary PCR 法でトランスポゾン挿入部周囲の領域を増幅し、シーケンス解析によりゲノム上のトランスポゾン挿入部位を決定した。その結果、トランスポゾンが *licC-licA* 遺伝子 (ERH_0862) に挿入された clone 100 および *licD* 遺伝子 (ERH_0863) に挿入された clone 112 を得た。

8. トランスポゾン挿入変異株の表現型解析

光学顕微鏡による形態観察のため、BHI-T80 培地で培養した藤沢株、clone 100、clone 112 をスライドガラス上に塗抹乾燥し、熱固定後、Favor G グラム染色キット (日水製薬、東京) を用いてグラム染色を行った。

金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡解析のため、菌培養液上にコロジオン膜貼付グリッド (400 メッシュ ; 日新 EM) を載せ、グリッド上に菌を吸着させた。10%FCS 加 PBS で洗浄、ブロッキングし、ER21 または TEPC-15 と室温で 1 時間反応させた。さらに、10 nm

金コロイド標識抗マウスイムノグロブリン (IgG、IgM、IgA) 抗体 (BB International、Cardiff、UK) と反応させた。乾燥後、透過型電子顕微鏡 (H-7500) で観察した。

トランスポゾン挿入変異株の莢膜多糖をウエスタンブロット解析するため、各培養菌を 65°C の熱水に懸濁し、20 分間攪拌しながら粗莢膜多糖を抽出した。これについて上記と同様の方法で ER21、TEPC-15 を用いたウエスタンブロット解析を行った。

9. 病原性試験

5 匹の ddy マウス (雌、6~8 週齢 ; 日本 SLC、静岡) に 2.0×10^8 cfu の藤沢株、clone 100 または clone 112 をそれぞれ皮下接種した。接種後 14 日までマウスの臨床症状と生死を観察した。また、2 頭のコンベンショナル豚 (4 週齢) に 3.41×10^9 cfu の clone 100 を頸部皮内に接種し、接種後 14 日まで臨床症状と生死を観察した。

結果

1. *cps-lic* 遺伝子群の RT-PCR 解析

豚丹毒菌藤沢株のゲノム上では、莢膜多糖の生合成に関わる 7 個の遺伝子がクラスター (*cps* 遺伝子群; ERH_855~ERH_861) を形成している [46]。また、PCho の生合成に関わる *lic* 遺伝子群 (ERH_862~ERH_865; ERH_862: *licC-licA*、ERH_863: *licD*、ERH_864: *licB*、ERH_865: *licC-licA*) は *cps* 遺伝子群の直下流に存在する (図 2-1A)。豚丹毒菌において *licA* 遺伝子と *licC* 遺伝子は融合しており、その遺伝子産物は二つの機能を有すると考えられる。7 組のプライマーセットを用いた RT-PCR 解析の結果、*cps* 領域から *lic* 領域はポリシストロニックな mRNA として転写されていることがわかった (図 2-1B)。この結果から、豚丹毒菌藤沢株では *cps* 遺伝子群と *lic* 遺伝子群が一つのオペロンを形成していることが明らかとなった。

2. 莢膜多糖の分離および解析

粗精製莢膜多糖を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した結果、0.12 M から 0.2 M NaCl で溶出した分画で総糖質量がピークを示した。豚丹毒菌莢膜抗原を認識するモノクローナル抗体 ER21 を用いたドットブロット解析を行い、陽性を示したピーク後半の分画を回収した (図 2-2A)。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、ER21 陽性であった空隙容量付近の分画を回収した (図 2-2B)。得られた分画に対し ER21 を用いたウエスタンブロット解析を行った結果、17.4 kDa~25.7 kDa の範囲にスメア状に陽性抗原がみとめられた (図 2-2C)。この泳動パターンは、莢膜多糖精製の各過程 (熱水抽出後; DNase、RNase、pronase、N-acetylmuramidase 処理後; メタノール-クロロホルム処理後; 陰イオン交換クロマトグラフィー後) において同様であった (図 2-2C)。ER21 が認識するエピトープおよび PCho の存在について解析するため、ゲル濾過後の溶出液を酸化処

理および PLC 処理を行い、ドットブロッキングおよびウエスタンブロッキング解析を行った結果、1,2-ジオールを開裂する酸化処理によって莢膜多糖の ER21 の反応性が消失した (図 2-2D)。また、PCho を認識するモノクローナル抗体 TEPC-15 を用いてウエスタンブロット解析を行った結果、ER21 陽性バンドと同様の位置に陽性反応が得られた (図 2-2E)。また、PLC 処理後の莢膜多糖では TEPC-15 に対する反応性が消失した (図 2-2E)。

3. *lic* 領域へのトランスポゾン挿入による変異株の作製と表現型解析

豚丹毒菌の莢膜多糖および PCho に *lic* 遺伝子群の不活性化がおよぼす影響を調べるため、*lic* 遺伝子群へのトランスポゾン挿入変異株を作製し、その表現型を親株である藤沢株と比較解析した。まず、藤沢株に対して pMC30 を用いてゲノム上の一か所にトランスポゾンが挿入された形質転換体を多数構築し、トランスポゾン挿入箇所をシーケンス解析により決定した。その結果、トランスポゾンが *licC-licA* 遺伝子 (ERH_0862) に挿入された clone 100 および *licD* 遺伝子 (ERH_0863) に挿入された clone 112 を得た。トランスポゾン挿入位置を図 2-1A に示す。グラム染色により菌の形態を観察した結果、藤沢株と clone 100、clone 112 とに明らかな相違はみられなかった (図 2-3A)。金コロイド粒子を用いた免疫電子顕微鏡解析の結果、clone 100、clone 112 の菌体表層には藤沢株と同様に ER21 と反応する抗原がみとめられた (図 2-3B)。一方、TEPC-15 と反応する抗原は藤沢株では菌体表層に多数みとめられたが、clone 100 および clone 112 ではこの抗原は消失していた (図 2-3B)。熱水抽出した粗莢膜多糖のウエスタンブロット解析の結果、clone 100 と clone 112 の莢膜多糖には TEPC-15 と反応するシグナルはみられず、免疫電子顕微鏡解析と同様の結果が得られた (図 2-4A)。また、ER21 を用いたウエスタンブロット解析では、clone 100 と clone 112 株の反応パターンは同様であったが、親株と比較して高分子領域にスメアが認められた (図 2-4B)。

4. トランスポゾン挿入変異株の病原性解析

2.0×10⁸ cfu の藤沢株（マウスに対する LD₅₀ = 10^{1.2}）、clone 100 および clone 112 をそれぞれ ddy マウスの皮下に接種した。その結果、藤沢株を接種したマウスは 2 日以内に全頭死亡したのに対し、2 つの PCho 欠損変異株を接種したマウスでは臨床症状なく 14 日間以上生存した。また、4 週齢の豚 2 頭に 3.41×10⁹ cfu の clone 100 を皮内接種した場合も、臨床症状はなく 14 日間以上生存した。

考察

PCho は宿主細胞への付着や侵入に関与する病原因子で、様々な病原細菌の表層分子を修飾している[44]。 *S. pneumoniae* では PCho の生合成に関わる *lic* 遺伝子群がテイコ酸合成遺伝子群とオペロンを形成し、それらの遺伝子産物による一連の酵素反応により、細胞壁を構成するテイコ酸が PCho により修飾される[42,43,45]。一方、豚丹毒菌では莢膜多糖の生合成に関わる *cps* 遺伝子群の直下流に *lic* 遺伝子群が存在する。そこで、豚丹毒菌の *cps* 領域から *lic* 領域にかけて RT-PCR により mRNA を解析したところ、*cps* 領域の 7 遺伝子、*lic* 領域の 4 遺伝子とその下流の *eutH* 遺伝子 (ERH_0866; ethanolamine utilization protein gene) がオペロンを形成していることが分かった。このことから、豚丹毒菌の莢膜多糖の生合成と PCho 残基の生合成が関連して行われることが予想された。また、*S. pneumoniae* においてエタノールアミンはコリンの代替栄養素として利用されることが知られている[51]。豚丹毒菌の PCho 生合成に関わるオペロンに *eutH* 遺伝子が含まれることから、豚丹毒菌においてもエタノールアミンをコリンの代替物として利用する機構の存在が示唆される。

Lachmann と Deicher [52]は豚丹毒菌の表層成分を解析し、分子量 14,000～22,000 の主要な抗原が莢膜多糖であると報告している。本研究では遺伝学的に予想された莢膜多糖の PCho による修飾を確かめるため、豚丹毒菌の莢膜多糖を精製し PCho による修飾の有無を調べた。ウエスタンブロット解析では、精製した莢膜多糖は ER21 と反応する 17.4～25.7 kDa のスメア状にバンドとして確認され、また、酸化処理で陽性反応が消失したことから、ER21 が認識する抗原は多糖であることが確認された。TEPC-15 を用いたウエスタンブロット解析では、莢膜多糖の移動度と同様の位置に陽性反応がみとめられ、この反応は PLC 処理により消失した。これらのことから、豚丹毒菌莢膜多糖は PCho で修飾されていることが明らかとなった。

豚丹毒菌細胞壁の構造は、*S. pneumoniae* を代表とする他のグラム陽性菌とは多くの点で異なっている。豚丹毒菌のゲノム上には、多くのグラム陽性菌で保存されているテイコ酸、リポテイコ酸の生合成に関わる遺伝子群やテイコ酸への d-アラニンの取り込みに関わる *dltABCD* オペロンが存在しない[46]。*S. pneumoniae* に関して、コリンは必須栄養素であり、テイコ酸の PCho 修飾は細胞壁の構造の安定性などに関わっている[53]。エタノールアミンはコリンの代替物としてテイコ酸に取り込まれるが、本来の PCho 残基による様々な生理機能は失われる。例えば、テイコ酸の PCho 残基は細胞分裂時の細胞壁の分解に関わる酵素 (amidase) の結合部位であるため、エタノールアミンでコリンを置き換えたコリン非依存性変異株では分裂時に細胞壁が分離されず、増殖菌は長い連鎖を呈する[54-56]。本研究において、豚丹毒菌 *lic* 遺伝子群へのトランスポゾン挿入により PCho 残基を欠損した変異株 clone 100 (*licC-licA*) および clone 112 (*licD*) が作製できた。また、これら PCho 欠損変異株は形態的には親株と同様であり、*S. pneumoniae* でみられるような連鎖状の増殖はみられなかった。このことから、豚丹毒菌にとって PCho 残基の有無は生存や増殖に影響しないことがわかった。さらに、PCho 欠損変異株には ER21 と反応する莢膜多糖抗原は残存しているものの、ウエスタンブロット解析で藤沢株と比較して高分子領域にスメアが認められるなど電気泳動の移動度にわずかな変化が認められた (図 2-4B)。したがって、今回作製した豚丹毒菌 PCho 欠損変異株における *lic* 領域へのトランスポゾン挿入はその上流の *cps* 領域の遺伝子発現やその機能には影響しないが、莢膜多糖の維持や莢膜の高次構造の安定性に PCho 残基が必要であることが推察された。

PCho は宿主体内での菌の定着や細胞付着に関与する病原因子であることが知られている[44]。豚丹毒菌莢膜多糖 PCho 残基の病原性への関与を調べるため、藤沢株と PCho 欠損変異株を用いて病原性試験を行ったところ、マウス、豚ともに PCho 欠損変異株の接種では臨床症状を示さず、死亡個体も確認されなかった。豚丹毒菌藤沢株は豚に敗血症を引き起こす強毒株で、1~3 ヶ月齢の豚では $10^7 \sim 10^8$ cfu の皮内接種により、接種後 3~4

日で敗血症の症状を呈し死亡個体が現れる[57-60]。これらのことから、豚丹毒菌莢膜多糖の PCho 残基は、他の病原体と同様に病原性に関与していることが明らかとなった。

本章の研究により、豚丹毒菌の莢膜多糖は PCho で修飾されていること、および PCho 残基は豚丹毒菌の病原性に重要な役割を担っていることが示された。様々な病原細菌で菌体表層の PCho 残基が粘膜への定着や宿主細胞への付着、侵入に関わると報告されている[40,41,44,61]。豚丹毒菌において莢膜多糖 PCho 残基が病原因子としてどのように働くか、病原性発現機序の解明が必要である。

要約

ホスホリルコリン (PCho) は様々な細菌の菌体表層構造物を修飾する病原因子であり、PCho 残基の生合成には *lic* 遺伝子群が関与している。豚丹毒菌藤沢株のゲノム解析から、豚丹毒菌の *lic* 遺伝子群は莢膜多糖合成に関連する *cps* 遺伝子群の直下流にタンデムに存在していた。このことから豚丹毒菌の菌体表層に PCho が存在し、莢膜多糖の生合成に関連することが予想された。そこで、豚丹毒菌莢膜多糖と PCho に関して、遺伝学的、生化学的解析を行った。その結果、*cps* 遺伝子群と *lic* 遺伝子群はオペロンを形成していた。また、精製した豚丹毒菌莢膜多糖は抗 PCho 抗体に反応する抗原を含んでおり、ゲノム解析から予想された通り、豚丹毒菌莢膜多糖は PCho 残基により修飾されていることが明らかとなった。また、*lic* 遺伝子領域へのトランスポゾン挿入によって PCho 欠損変異株を作製可能した。このことから、PCho は豚丹毒菌の生存に必須ではないことがわかった。この PCho 欠損変異株では、SDS-PAGE による莢膜多糖抗原の移動度に変化がみとめられたことから、PCho は莢膜多糖の構造維持に関与することが示唆された。また、PCho 欠損変異株は豚、マウスに対する病原性が大きく低下していた。これらの結果から、豚丹毒菌の莢膜多糖は PCho で修飾されており、PCho 残基は豚丹毒菌の病原性に重要であることが明らかとなった。

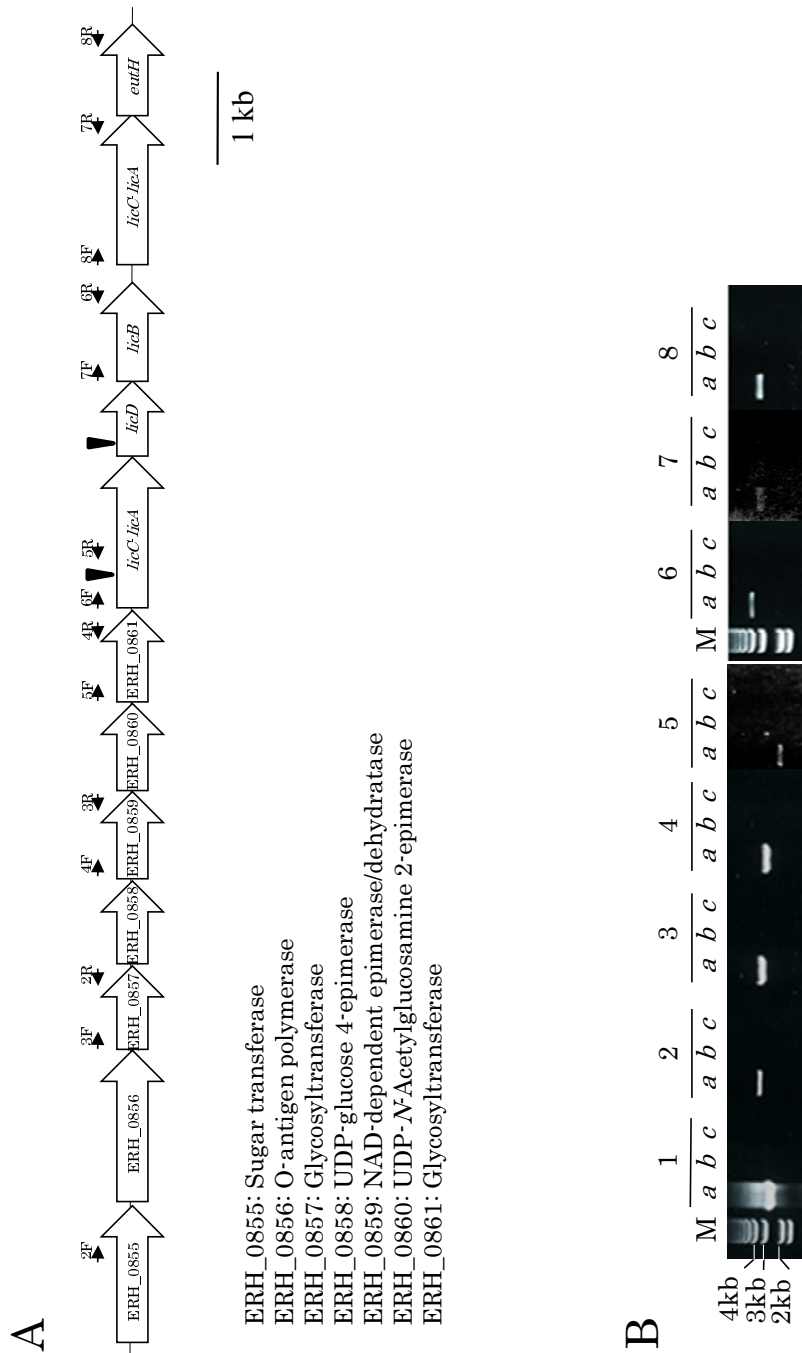


図2-1. 豚丹毒菌ゲノム *cps-lic* 領域のRT-PCR解析

(A) *cps-lic* 領域の模式図。矢印はRT-PCR解析に用いたプライマーが対応する位置を示す。矢頭はトランスポゾン挿入変異株のトランスポゾン挿入部位。

(B) *cps-lic* 領域のRT-PCR解析。レーン上の数字はそれぞれ用いたプライマー名に対応する。プライマー1F-1Rは23S rRNA遺伝子上に設計した陽性コントロールである。また、各レーン aはcDNAに対してPCR法で増幅したバンドを示す。bは逆転写前のRNAを、cは鋳型DNAなしで増幅した陰性コントロール。Mは分子量マーカー。

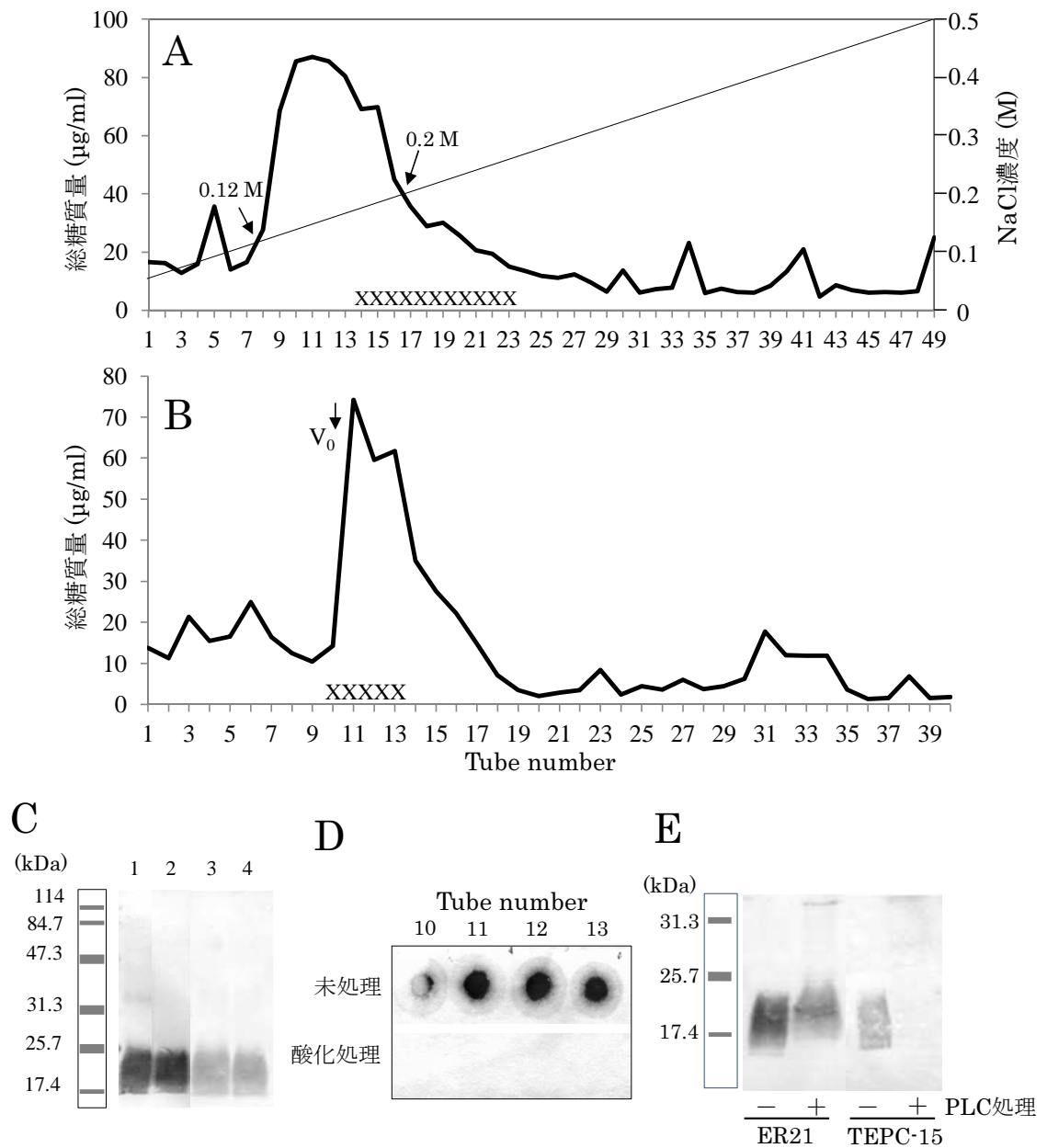


図2-2. 豚丹毒菌莢膜多糖の生化学的解析

(A) 陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出に用いたNaCl濃度と得られた各分画の総糖質量。XはER21を用いたドットプロット法で陽性を示した分画を表す。

(B) ゲル濾過クロマトグラフィーで得られた各分画の総糖質量。XはER21を用いたドットプロット法で陽性を示した分画を表す。V₀は空隙容量を示す。

(C) 各抽出段階のCPSに対するER21を用いたウエスタンブロット解析。レーン1は熱水抽出後、レーン2はDNase、RNase、pronase、N-acetylmuramidase処理後、レーン3はメタノールクロロホルム処理後、レーン4は陰イオン交換クロマトグラフィー後の莢膜多糖溶液。

(D) ゲル濾過クロマトグラフィーで得られた各分画の酸化処理とER21を用いたドットプロット解析。

(E) ゲル濾過クロマトグラフィーで得られた莢膜多糖のPLC処理とウエスタンブロット解析。

A



B

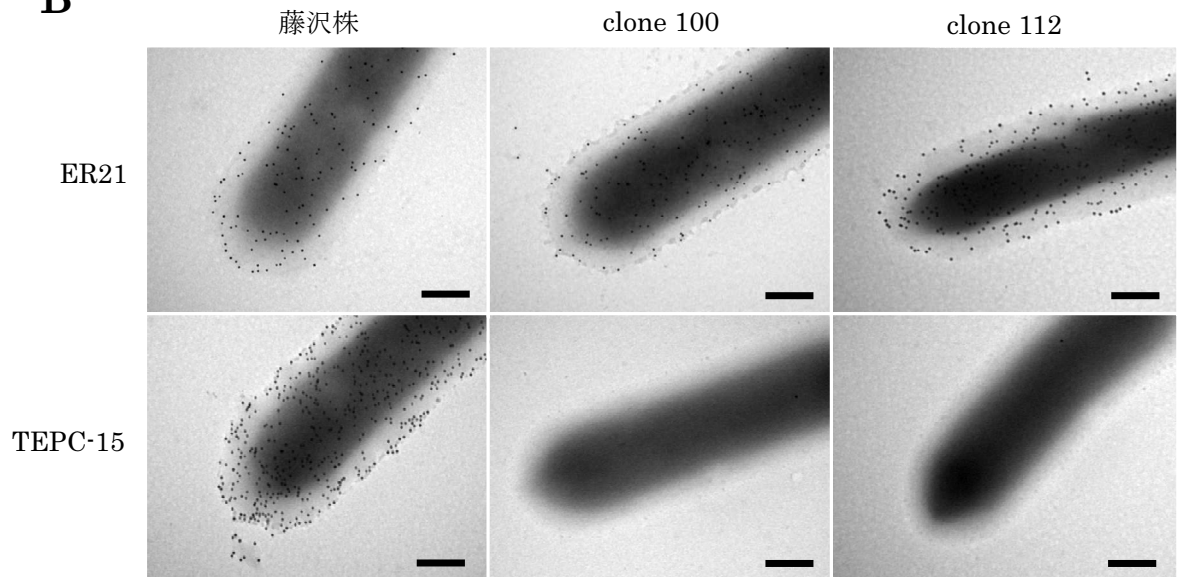
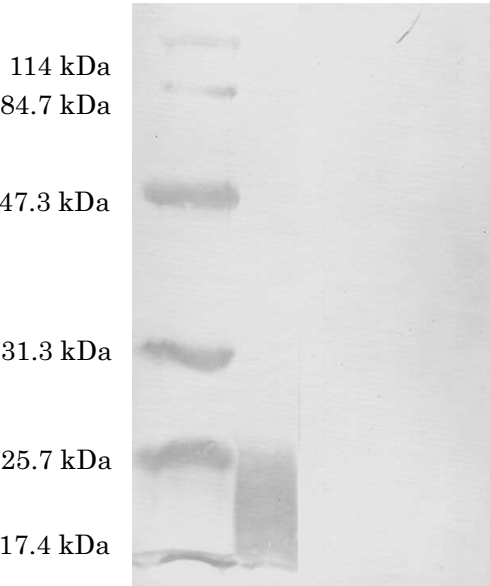
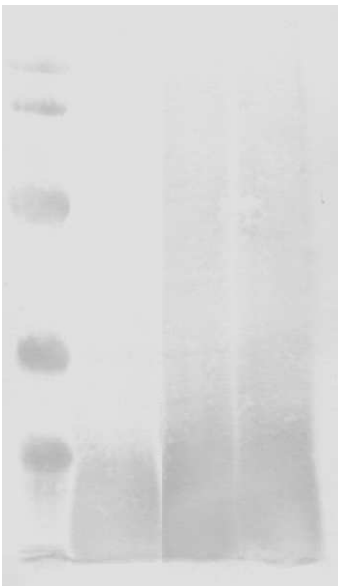


図2-3. トランスポゾン挿入変異株の表現型解析
(A) グラム染色。(B) イムノゴールド電子顕微鏡観察。Scale bar = 200 nm。

A



B



Yarrowia
藤沢株
clone 100
clone 112

図2-4. トランスポゾン挿入変異株莢膜多糖のウエスタンブロット解析
(A) TEPC-15を用いたウエスタンブロット解析。
(B) ER21を用いたウエスタンブロット解析。

プライマー名	配列	増幅配列のサイズ (bp)
1F	5'-CAA CCT TGC GAA CTG AAA CA-3'	2,594
1R	5'-GGA GTT GGC TTC GTG CTT AG-3'	
2F	5'-AGC ATG ATG ACC GAA TCA CA-3'	3,230
2R	5'-TTG CTT GAT ACC ATG CCT CA-3'	
3F	5'-AGG GAT GCA TCG TCA CAG TA-3'	3,413
3R	5'-GGC GTA TCA GGA TCA AAT GG-3'	
4F	5'-CTT GCG TAT GAC CGC AAT AA-3'	3,489
4R	5'-CTC TGC ACT GTC CGT TCG TA-3'	
5F	5'-TGA TCT CGC AAA CGG ACT AA-3'	1,935
5R	5'-AGC CAG CAG TTC TCC CAG TA-3'	
6F	5'-CGG AGG GTT TTA TGT TTT CG-3'	3,488
6R	5'-CGT GGA TTT TCG GAA GAAAG-3'	
7F	5'-GG CAT CCA CGA TGT TCT TA-3'	2,702
7R	5'-GTG CAA GTG CTT TGT TTC CA-3'	
8F	5'-ACG CTA CAC ACG CTC TAG CA-3'	2,807
8R	5'-AAC GGA AGG ATC AAC TGT GG-3'	

表2-1. RT-PCR解析に用いたプライマー

プライマー名	配列
MC270'+N9	5'-CGCACAGATGCGAAGGGCGANNNNNNNNN-3'
MC270'	5'-CGCACAGATGCGAAGGGCGA-3'
MC256'+N9	5'-CAGCCCCGACACCCGCCAACANNNNNNNNN-3'
MC256'	5'-CAGCCCCGACACCCGCCAACA-3'

表2-2. Arbitrary PCR法およびシーケンス解析に用いたプライマー

第三章

豚丹毒菌莢膜 PCho 残基の血管内皮細胞への付着性

序論

急性敗血症型の豚丹毒では、腎糸球体をはじめ全身諸臓器の中小血管において、微小血栓や菌塞栓、内皮傷害を伴う出血性血管炎などの血管病変がしばしば観察される[1]。このことから、血管および血管内皮細胞は豚丹毒菌の病原性発現において重要な標的であると考えられる。これまでに、豚丹毒菌が産生する菌体外酵素のひとつであるノイラミニダーゼがラット血管内皮細胞への付着に重要であることが *in vitro* の実験により報告されている[6]が、豚丹毒菌による血管病変形成機序に関しての知見は少ない。

菌が宿主細胞に付着するには、菌体表層の付着因子と宿主細胞上の受容体との相互作用が必要である。第二章において、豚丹毒菌の莢膜多糖は PCho 残基による修飾を受けていることを明らかにした。これまで、PCho 残基の病原性への関与は *S. pneumoniae* や *H. influenzae*、*Neisseria spp.* でよく調べられている。これらの細菌において、PCho 残基は宿主の血管内皮細胞や気管支上皮細胞などに発現する血小板活性化因子受容体 (PAFR) を認識して結合し、細胞への付着および細胞内への侵入に関与する[40,41,44,61]。

また、PCho 残基は宿主細胞を直接認識するだけでなく、菌体表層に発現するコリン結合タンパク質 (CBPs) のアンカーとしても働いている。CBPs の多くは C 末端側に GW リピート構造などのコリン結合領域を有し、非共有結合性に PCho と結合している[62,63]。*S. pneumoniae* は 10~15 種類の CBPs を菌体表層に発現しており、その一部の CBPs は付着因子として病原性に関与することが知られている[53]。一方、豚丹毒菌においては、ゲノム解析の結果、3 種類のタンパク質 (SpaA、CbpA、CbpB) が GW リピートを

有しており、それらは CBPs であると予想されている[46]。このうち SpaA タンパク質は古くから豚丹毒菌の主要防御抗原として知られているが[58,64,65]、その機能や病原性との関与については明らかとなっていない。

第二章で、豚丹毒菌 PCho 欠損変異株はマウスおよび豚に対して病原性が低下していることが示された。このことから、豚丹毒菌の病原性発現機序を明らかにするうえで、血管病変形成に果たす PCho 残基の役割を調べることは重要である。本章では、PCho 残基および PCho 残基を介して菌体表層に発現すると予想される SpaA タンパク質に注目して、その付着因子としての病原性と血管病変形成に果たす役割を明らかとするため、豚丹毒菌藤沢株および PCho 欠損変異株 (clone 100、clone 112) の豚血管内皮細胞 (PECs) への付着性を比較解析した。

材料と方法

1. 菌株と培養

豚丹毒菌藤沢株および第二章で作製した PCho 欠損変異株 clone 100、clone 112 を用いた。各菌株は BHI-T80 培地 (pH 8.0) で 37°C で培養した。

2. PECs の分離と培養

PECs はコンベンショナル豚 (4 週齢) の胸部大動脈より分離した。摘出した大動脈を切り開き、冷 PBS で内腔の血液を洗浄後、大動脈内壁をメスの刃で軽くこすり内皮細胞を剥離した。剥離した内皮細胞は 10% 牛胎子血清と抗生剤 (100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、0.25 µg/ml アンホテリシン B) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-FCS ; Invitrogen) 中で 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。増殖した PECs について対数増殖期の細胞を 3~4 日ごとに継代した。増殖した細胞が内皮細胞由来であることを確認するため、抗 von Willebrand factor 抗体 (DAKO-Japan) および抗 CD31 抗体 (GeneTex, Irvine, CA, USA) を用いて免疫蛍光法で染色し、レーザー共焦点顕微鏡 (TCS-SP5 ; Leica) で陽性シグナルを確認した。

3. PAFR 遺伝子の COS-7 細胞株への導入

PAFR 遺伝子配列にはイントロンが含まれない[66,67]ため、マウスおよび豚の PAFR 遺伝子配列についてそれぞれ J774.1 細胞 (マウスマクロファージ様細胞株) および豚末梢血単核球のゲノムを鋳型として PCR 法により直接増幅した。用いたプライマーはマウス PAFR (mPAFR) および豚 PAFR (pPAFR) の遺伝子配列 (GenBank accession number : mPAFR ; NW_001030750.1、pPAFR ; AF124054) を元に設計した (表 3-1)。PCR で増幅された断片を制限酵素処理し、pFLAG-CMV4 ベクター (Sigma-Aldrich) に組

み込んだ。COS-7 細胞(アフリカミドリザル腎臓由来細胞)を DMEM-FCS を用いて 12 mm ガラスボトムディッシュで培養し、各コンストラクトを含むプラスミドを Lipofectamine™ LTX reagent (Invitrogen) を用いて COS-7 細胞に遺伝子導入した。導入後 6 時間で、遺伝子導入用の培地から DMEM-FCS 培地に交換し、さらに一晚培養して実験に供した。陰性コントロールとして、発現ベクタープラスミドのみを COS-7 細胞に導入したものをを用いた。

4. 豚丹毒菌付着試験

継代数が 3~7 回の PECs を 96 穴プレート (Sigma-Aldrich) にコンフルエントの状態まで培養した。豚丹毒菌藤沢株もしくは PCho 欠損変異株を DMEM-FCS に懸濁し、各ウェルに約 5×10^5 cfu ずつ加えて、37°C で 60 分間感染させた。その後、各ウェルを PBS で 3 回洗浄し、付着した菌数を測定するため、96 穴プレート内の細胞を回収、BHI-T80 培地で希釈し、BHI-T80 寒天培地に播種した。一晚培養後、生えてきたコロニーを数え、付着菌数とした。

また、PAFR のアンタゴニスト、PCho 残基および SpaA タンパク質に対する抗体を用いて付着阻害実験を行った。96 穴プレートに培養した PECs に対して、各用量 (0 nM、10 nM、100 nM、500 nM) の PAFR アンタゴニスト (WEB-2086; Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) を 30 分間作用させ、その後付着実験と同様に菌を感染させた。抗体による付着阻害実験では、抗 PCho モノクローナル抗体 (clone TEPC-15) もしくは SpaA タンパク質で免疫した家兎血清を DMEM-FCS に懸濁した豚丹毒菌と 30 分間反応させ、その後 PECs に感染させた。それぞれの陰性コントロールとして正常マウス血清およびウサギ血清を用いた。PAFR アンタゴニストおよび各抗体濃度は、感染中も同様に保たれるように調整した。付着した菌数は付着試験と同様に測定した。

PAFR 過剰発現細胞への豚丹毒菌の付着を観察するために免疫蛍光染色を行う

た。12 mm ガラスボトムディッシュに各 PAFR 発現ベクターを導入した COS-7 細胞を培養し、 1.0×10^6 cfu/dish の藤沢株をアプライし 37°C で 60 分間感染させた。細胞を洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで 4°C 10 分間固定した。次いで一次抗体として抗豚丹毒菌家兔血清を、二次抗体として Alexa Fluor® 546 標識抗ウサギ IgG (Invitrogen) をそれぞれ 37°C で 60 分間反応させ染色した。PAFR 遺伝子を導入した COS-7 細胞の染色には、一次抗体として抗 FLAG モノクローナル抗体 (clone M5 ; Sigma-Aldrich) を、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG (Invitrogen) をそれぞれ 37°C で 60 分間反応させた。染色した標本は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5 ; Leica) を用いて観察した。

5. イムノゴールド電子顕微鏡観察

藤沢株、clone 100、clone 112 を BHI-T80 培地で 37°C 一晩培養し、培養液上にコロジオン膜貼付グリッド (400 メッシュ ; 日新 EM) を載せ、グリッド上に菌を吸着させた。10%FCS 加 PBS で洗浄、ブロッキングし、SpaA タンパク質の N 末を認識するモノクローナル抗体と室温で 1 時間反応させた。さらに、10 nm 金コロイド標識抗マウスイムノグロブリン (IgG、IgM、IgA) 抗体 (BB International) を反応させた。乾燥後、透過型電子顕微鏡 (H-7500 ; 日立ハイテク) で観察した。

6. 統計解析

付着試験および付着阻害試験において、付着菌数は 3~4 ウェルについて計測し、藤沢株や陰性コントロールの PECs への付着数に対する割合 (%) の平均値 \pm 標準偏差で表記した。また、PAFR 遺伝子導入細胞への付着試験に関しては、抗 FLAG 抗体陽性細胞 50 個当たりの付着菌数を計測した。それぞれ独立した 3 回の実験を行い、図は最も典型的な実験結果について示した。有意性を検定するため、多群間の比較には Tukey 法による多重比較を、二群間の比較には対応のない Student の *t* 検定を行った。

結果

1. 豚丹毒菌の PECs への付着

豚丹毒菌 PCho 残基が血管内皮細胞への付着性に関与するかを調べるため、藤沢株と PCho 欠損変異株 clone 100、clone 112 の PECs に対する付着性を比較した。その結果、PCho 欠損変異株の PECs への付着数は藤沢株と比較し有意に減少した (図 3-1A)。COS-7 に対する付着数は、藤沢株と PCho 欠損変異株で同等であった。また、藤沢株の PECs への付着は抗 PCho モノクローナル抗体により有意に抑制された (図 3-1B)。

2. 豚丹毒菌の PECs への付着における PAFR の関与

豚丹毒菌の PCho 残基に対する PECs 側の受容体として、PAFR の関与について調べた。PECs を様々な濃度の PAFR アンタゴニストで処理し藤沢株を感染させた結果、いずれの濃度でも PECs への藤沢株の付着は阻害されなかった (図 3-2)。次に、COS-7 細胞に pPAFR もしくは mPAFR を遺伝子導入し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫蛍光染色した結果、細胞膜上に PAFR の発現が確認された (図 3-3A)。同細胞に対して藤沢株の付着を計測した結果、藤沢株の付着は陰性コントロール細胞と同等であり、pPAFR、mPAFR を過剰発現させた細胞への特異的な付着はみられなかった (図 3-3B)。

3. 豚丹毒菌の PECs への付着における SpaA タンパク質の関与

豚丹毒菌 SpaA タンパク質は C 末端側に GW リピート構造を有しており、CBPs であると予想されている [46]。免疫電子顕微鏡観察の結果、金コロイドは藤沢株の菌体表層に散在性に、特に両末端部に多くみとめられた (図 3-4)。一方、PCho 欠損変異株の clone 100 および clone 112 では菌体表層に金コロイドはみとめられなかった (図 3-4)。そこで、SpaA タンパク質が豚丹毒菌の PECs への付着に関与しているかを調べるため、抗 SpaA 家

兔血清を用いて付着阻害実験を行った。その結果、藤沢株の PECs への付着は抗 SpaA 家兔血清によって阻害されたが、PCho 欠損変異株の PECs への付着は抗 SpaA 家兔血清で抑制されなかった (図 3-5)。

考察

PCho 残基は粘膜の常在菌や様々な病原菌 (*S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *Neisseria* spp. など) の菌体表層構造としてみとめられる。PCho 残基は粘膜への定着、細胞への付着や侵入、宿主免疫機構の攪乱などに関わっており、これらの細菌の病原性発現に重要な役割を担っている[40,41,61,68,69]。さらに、菌体表層の PCho 残基は宿主の血管内皮細胞や粘膜上皮細胞の細胞膜上に発現する PAFR と直接結合することが知られている[70]。*S. pneumoniae* では、*in vitro* において PCho 残基と PAFR の結合により血管内皮細胞や気管支上皮細胞への付着、侵入が亢進すること、*in vivo* では PAFR ノックアウトマウスの *S. pneumoniae* に対する感受性が低下することが知られている[40,71]。一方、*H. influenzae* では、PCho 残基と PAFR の結合は、気管支上皮細胞への侵入が亢進するが、菌の付着には関与しない[41]。また、PAFR は M 細胞を含む腸管上皮細胞にも発現しており、PAFR アンタゴニストにより M 細胞による *H. influenzae* 取り込みが抑制されることが報告されている[72]。このように PCho 残基は粘膜病原菌の多くが保有している病原因子であり、様々な病原性発現機序に関与している。

本研究では、豚丹毒菌の野生株である藤沢株は PCho 欠損変異株と比較し、PECs への付着能が有意に高かった。さらに、藤沢株の PECs への付着は抗 PCho 抗体により阻害された。これらの結果から、豚丹毒菌に関しても他の病原細菌と同様に、PCho 残基が宿主血管内皮細胞への付着に重要であることが示された。しかし、藤沢株の PECs への付着は PAFR アンタゴニストでは阻害されず、また、豚およびマウスの PAFR 遺伝子を導入した COS-7 細胞に対して藤沢株の特異的な付着はみとめられなかった。これらの結果は、豚丹毒菌の PCho 残基による細胞への付着は、宿主細胞上の PAFR を介したものでないことを示している。第二章の結果から、豚丹毒菌では PCho 残基は莢膜多糖を修飾していることがわかったが、*S. pneumoniae* では細胞壁上のテイコ酸およびリポテイコ酸を、*H.*

influenzae では LPS を、*Neisseria gonorrhoeae* では線毛をそれぞれ PCho が修飾している[36-38]。このように PCho 残基を含む構造物は菌種によって異なっており、これにより PCho 残基の PAFR への結合性も異なることが推察される。そのため、豚丹毒菌莢膜多糖の PCho 残基が PAFR と立体構造的に結合できない可能性が考えられる。

PCho 残基は様々な菌種で CBPs のアンカーとして利用されている。豚丹毒菌藤沢株のゲノム上に、コリン結合ドメインである GW リピート構造を有する 3 種類のタンパク質 (SpaA、CbpA、CbpB) がコードされている[46]。抗 SpaA モノクローナル抗体によるイムノゴールド免疫電顕解析の結果、SpaA タンパク質は藤沢株の菌体表層に局在していること、PCho 欠損変異株では菌体表層から消失していることがわかった。また、豚丹毒菌藤沢株の PECs への付着が抗 SpaA 家兎血清により阻害されることがわかった。これらの結果から、SpaA タンパク質は豚丹毒菌の莢膜 PCho 残基に結合して菌体表層に局在すること、豚丹毒菌の PECs への付着に関与することが明らかとなった。豚丹毒菌の感染防御抗原として知られていた SpaA タンパク質の機能や特徴はこれまで不明であったが、本実験の結果から SpaA タンパク質は CBPs であり、付着因子として働くことが示された。

S. pneumoniae や *H. influenzae* において、PCho 残基と PAFR への結合により宿主細胞内への菌の侵入が増加することが報告されている[40,41]。野外例の豚丹毒菌感染豚では血管内皮細胞内への菌の侵入がみられることがある[1]。しかし、*in vitro* の本実験では PECs 細胞質内への豚丹毒菌の侵入はみられなかった。豚丹毒菌は食細胞や第一章で判明した特殊な上皮細胞など一部の細胞に対して侵入能はみとめられるが、その分子機構はほとんどわかっていない。豚丹毒菌の細胞内侵入には、PECs への付着とは異なるリガンド/受容体を介した分子メカニズムの存在が推察される。

本章の研究により、豚丹毒菌藤沢株は PCho 欠損変異株と比較し PECs への付着性が高く、PCho 残基は PECs への付着に重要であることがわかった。しかし、他の病原細菌と異なり、豚丹毒菌の PCho 残基と PAFR との直接作用による付着ではなく、CBPs で

ある SpaA タンパク質を介することが明らかとなった。豚丹毒菌の宿主細胞への付着や侵入に関して理解を深めるためには、様々な豚丹毒菌体表層のリガンドと宿主細胞の受容体による分子メカニズムの解明が必要と考えられる。

要約

急性型豚丹毒では全身の中小血管に血栓、菌塞栓や内皮傷害を伴う血管炎などの血管病変が観察される。そのため、血管内皮細胞は豚丹毒菌の主要な標的細胞であると予想される。病原細菌の菌体表層に存在する PCho 残基は、宿主の血管内皮細胞や上皮細胞などに発現する血小板活性化因子受容体 (PAFR) を認識して結合し、細胞への付着に関与している。第二章で豚丹毒菌莢膜多糖は PCho で修飾されていること、および PCho 欠損変異株の病原性が低下することが明らかとなった。このため本章では、PCho 残基が豚丹毒菌の血管内皮細胞への付着に果たす役割を明らかとするため、豚血管内皮細胞 (PECs) を用いて *in vitro* での付着試験を行った。その結果、PCho 欠損変異株は野生株と比較し PECs への付着能が低下しており、PCho 残基は PECs への付着に重要であることが示された。しかし、アンタゴニストによる付着阻害試験や PAFR 過剰発現細胞に対する付着試験により、豚丹毒菌の PECs への付着には PAFR を介していないことが示唆された。一方、豚丹毒菌の SpaA タンパク質は PCho 残基に結合するコリン結合タンパク質であり、SpaA タンパク質に対する抗体により豚丹毒菌の PECs への付着が阻害された。これらの結果から、豚丹毒菌 PCho 残基は PECs への付着に重要であることがわかった。しかし、他の病原細菌と異なり、豚丹毒菌の PCho 残基と PAFR との直接作用による付着ではなく、SpaA タンパク質を介することが明らかとなった。

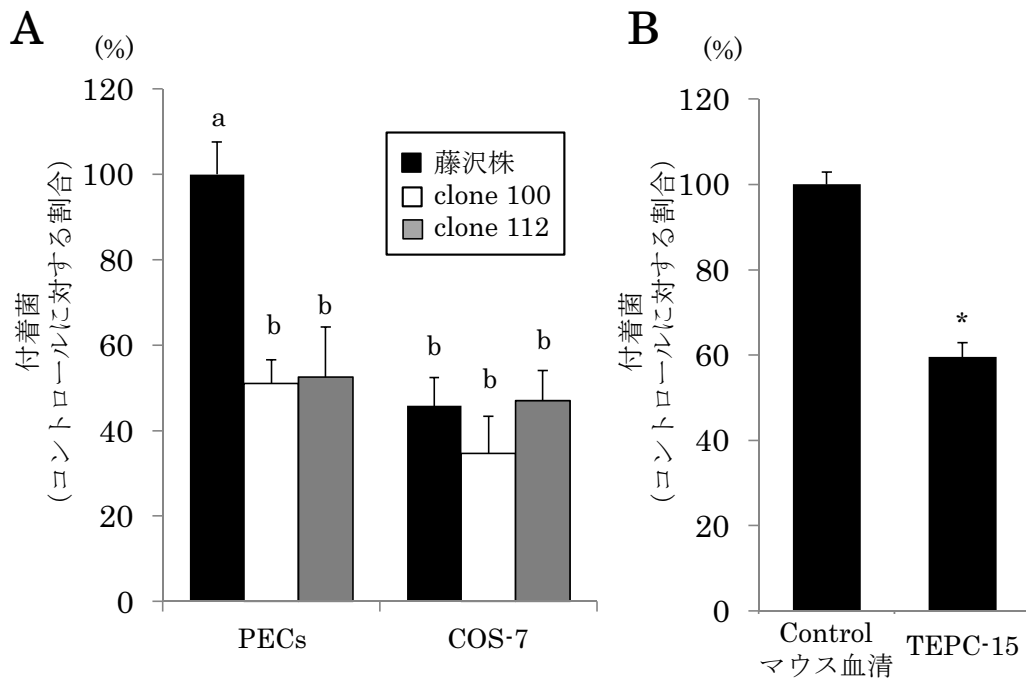


図3-1. 豚丹毒菌の付着および付着阻害試験

(A) 豚丹毒菌藤沢株とPCho欠損変異株のPECsおよびCOS-7細胞への付着試験。

各付着菌数は、藤沢株がPECsに付着した菌数に対する割合（平均値±標準偏差）で表した。異なる符号のついた値同士は統計学的に有意な差（ $p < 0.01$ ）がある。

(B) 抗PChoモノクローナル抗体（TEPC-15）による付着阻害実験。

各付着菌数は、正常マウス血清添加時の付着菌数に対する割合（平均値±標準偏差）で表した。*, $p < 0.01$ 。

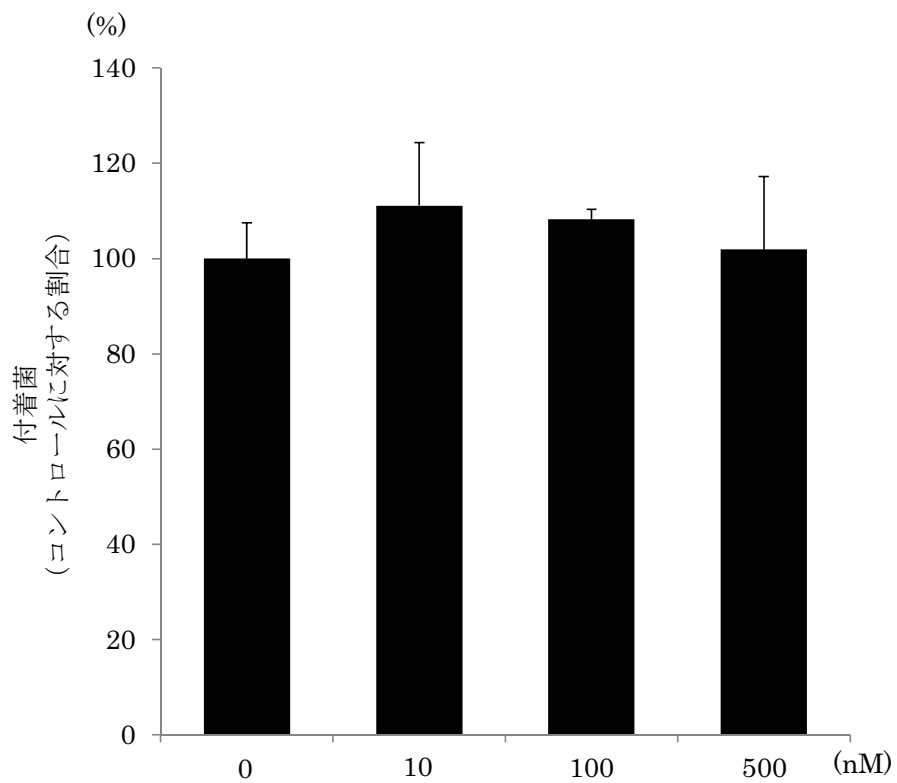


図3-2. PAFRアンタゴニスト (WEB-2086) による付着阻害試験
 各付着菌数は、PAFRアンタゴニストを含まない条件での付着菌数に対する割合 (平均値±標準偏差) で表した。

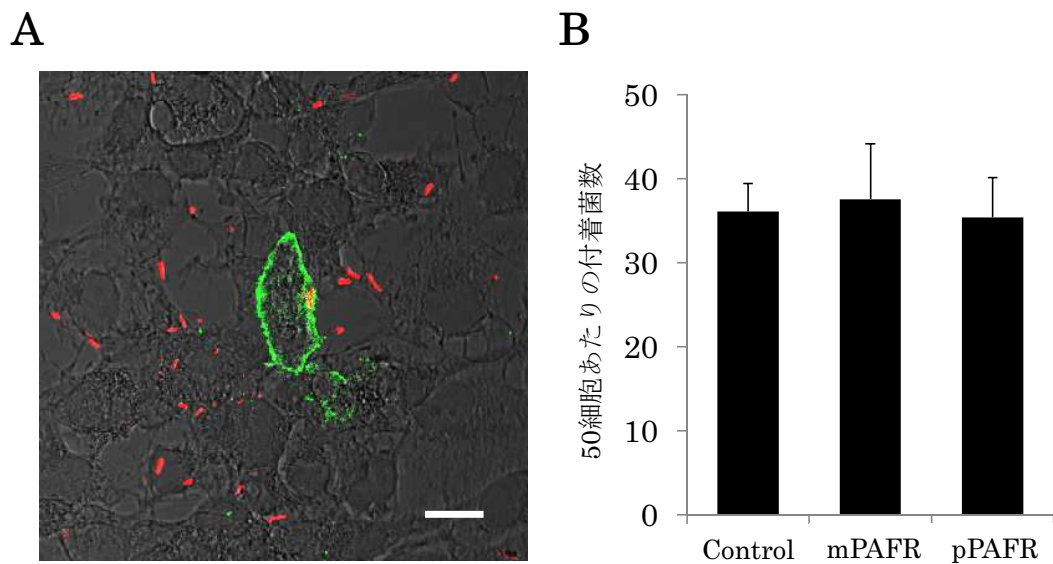


図3-3. PAFR過剰発現COS-7細胞への付着試験

(A) 豚PAFR過剰発現COS-7細胞への藤沢株の付着。細胞の微分干渉像と抗FLAGモノクローナル抗体（緑）および抗豚丹毒菌家兔血清（赤）を用いた免疫蛍光染色像の重ね合わせ像。Scale bar = 10 μ m。

(B) マウスおよび豚PAFR過剰発現細胞50個あたりの付着菌数（平均値±標準偏差）。

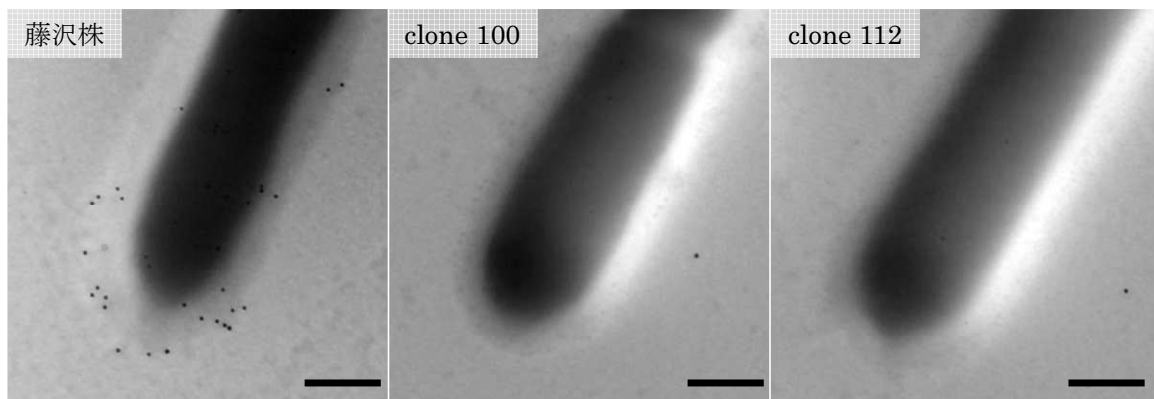


図3-4. 抗SpaAモノクローナル抗体を用いたイムノゴールド免疫電子顕微鏡観察
Scale bar = 200 nm。

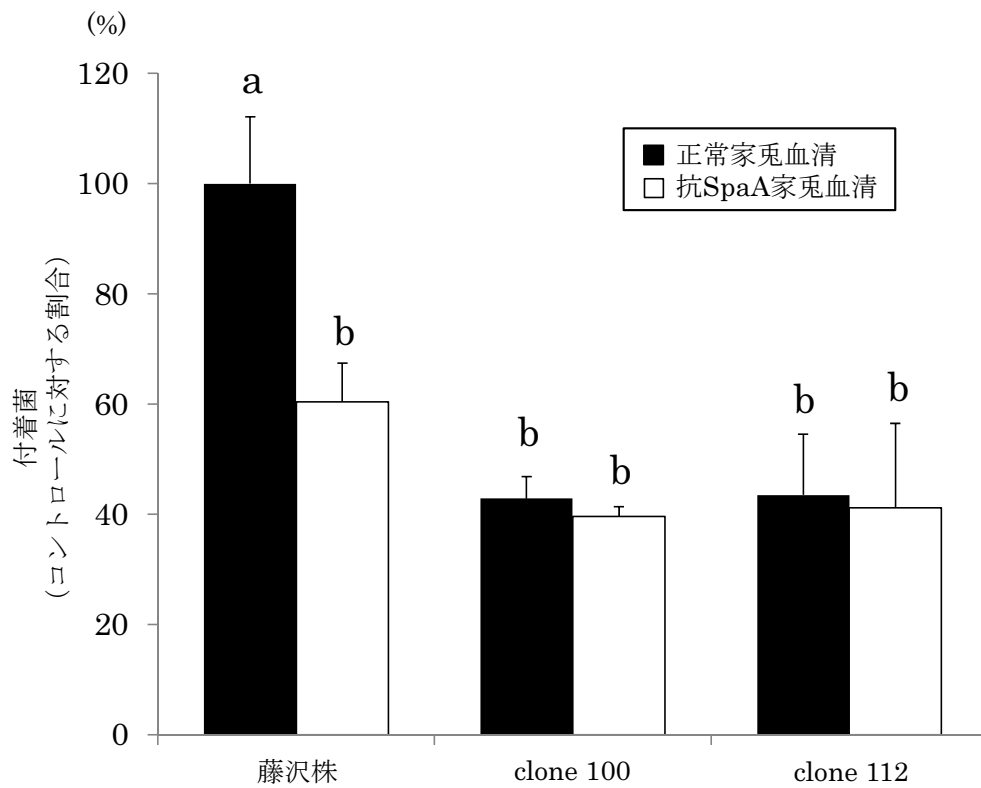


図3-5. 抗SpaA家兎血清による付着阻害試験

付着菌数は、正常家兎血清存在下での藤沢株の付着菌数に対する割合（平均値±標準偏差）で表した。異なる符号のついた値同士は統計学的に有意な差（ $p < 0.01$ ）がみとめられた。

プライマー名	配列
mouse PAFR_F	5'-CCCA <u>AAGCTT</u> ATGGAGCACAATGGCTCCTTT-3'
mouse PAFR_R	5'-CGGGATCCTTAATTTTTTCAGCGACACAATA-3'
porcine PAFR_F	5'-CCCA <u>AAGCTT</u> ATGGAGCAAATGATTCCTGG-3'
porcine PAFR_R	5'-CGGGATCCTTTTTTGAGGGAATTGACAGGGA-3'

下線部は制限酵素部位

表3-1. PAFR遺伝子のクローニングに用いたプライマー

第四章

豚血管内皮細胞における

豚丹毒菌 SpaA タンパク質に対する受容体の探索

序論

病原細菌の宿主細胞への付着は感染成立において最初の重要なステップである。細菌の付着には、菌体表層の付着因子と宿主細胞上の受容体の結合が必要となる。細菌の受容体への結合は、単に菌の細胞表面への定着だけでなく、受容体からのシグナル伝達によって誘導される菌の取り込み、免疫応答、炎症反応などを引き起こす[73]。また、付着因子と受容体の特異的な結合は、その受容体を発現する特定の細胞種に対してのみ起こるので、細菌の細胞親和性、組織親和性を規定する決定的な要因となりうる。

多くのグラム陰性菌と一部のグラム陽性菌では線毛が付着因子として重要な役割を担っている[73]。また、多くの菌体表層タンパク質についても付着因子としての機能が報告されている[73]。豚丹毒菌は線毛を欠いているため、主に表層タンパク質が付着因子として働いていると考えられる。これまでに豚丹毒菌の付着因子として RspA および RspB が同定されているが、これらはフィブロネクチンやコラーゲン type I、IV といった細胞外基質への付着に関与している[9]。しかし、豚丹毒菌の宿主細胞への付着に関わる因子は未だみつかっていない。

CBPs は C 末端側もしくは N 末端側に約 20 アミノ酸からなる GW モチーフのリピート構造（コリン結合ドメイン）を有する一群のタンパク質である。コリン結合ドメインが菌体表層の PCho 残基と結合することで、CBPs は菌体表層に局在する[62,63]。CBPs は *Staphylococcus aureus* や *Streptococcus* spp.、*Clostridium* spp.、*Listeria*

monocytogenes などのグラム陽性菌に広くみとめられる[53,74-76]。 *S. pneumoniae* は 10～15 種類の CBPs を有し、細胞壁の生理機能の維持、補体系への干渉、細胞への付着など多彩な機能を担っている[53]。その中で、PspC は、宿主細胞上の polymeric Ig receptor (多量体免疫グロブリンレセプター) を介して鼻咽頭上皮細胞への付着に関与することが知られている[77]。

豚丹毒菌 SpaA タンパク質は菌体表層に発現する主要防御抗原であり、C 末端側に GW モチーフを有する[64]。第三章の結果から、SpaA タンパク質は莢膜 PCho 残基と結合する CBPs であること、また、PECs への付着に関与する付着因子であることがわかった。また、藤沢株と PCho 欠損変異株の Cos-7 細胞への付着には差がなかったことから、PECs 上には SpaA タンパク質に対する特異的な受容体が存在すると考えられた。宿主細胞側の受容体を特定することは豚丹毒菌の血管への親和性を理解するうえで非常に重要である。そこで本章では、プルダウン法によるタンパク質相互作用解析と LC-MS/MS 法によるタンパク質同定を行い、SpaA タンパク質に対する PECs 上の受容体を探索した。

材料と方法

1. リコンビナント SpaA (rSpaA) タンパク質の作製

豚丹毒菌藤沢株のゲノムから表 4-1 に示したプライマーを用いて *spaA* 遺伝子配列を増幅し、QIAexpress kit (Qiagen) の pQE-30 プラスミドにクローニングした。このプラスミドを *E. coli* M15 株 (Qiagen) に導入し、1 mM の IPTG を添加し一晩培養した。菌を遠心回収後、10 mM イミダゾールを含むリン酸塩溶液 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl) に浮遊した。菌浮遊液を氷中で超音波破碎し、遠心後上清を回収した。得られた上清から、Ni-NTA アガロース (Qiagen) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより rSpaA タンパク質を精製した。

2. rSpaA 吸着ビーズの作製

精製した rSpaA タンパク質を UltraLink® Biosupport Medium (PIERCE Biotechnology, IL, USA) を用いて、ビーズ担体に吸着させた。ビーズと rSpaA タンパク質を 0.6 M クエン酸ナトリウム中で混合し、室温で 2 時間、回転しながら反応させた。遠心後上清を取り除き、3.0 M エタノールアミンを加え 2 時間反応させ、ビーズの未反応残基を失活させた。遠心後、rSpaA 吸着ビーズは 1.0 M 塩化ナトリウムで洗浄し、PBS 中で保存した。

3. PECs からのタンパク質抽出

PECs を DMEM-FCS 中で 75mm² フラスコに培養した。PBS で洗浄後、氷冷した 0.5 mM 塩化マグネシウム、150 mM 塩化ナトリウムを加えた Tris 塩酸塩緩衝液 (TBS) 中で細胞をスクレイパーにより回収した。遠心後、細胞ペレットを 200 mM の 1-O-n-オクタール-β-D-グルコピラノシド (ナカライテスク、京都) および Protease inhibitor (complete

EDTA free ; Roche) を加えた TBS で懸濁し、数分おきに攪拌しながら氷上で 40 分間反応させた。遠心後、上清を回収し、PECs からのタンパク質抽出液とした。

4. プルダウン法

プルダウン法により rSpaA タンパク質と相互作用する PECs タンパク質を回収した。rSpaA 吸着ビーズと PECs から抽出したタンパク質溶液とを混合し、4℃で一晩回転しながら反応させた。反応後のビーズをカラムに充填し、未反応液を回収した。TBS で洗浄後、100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.5) で rSpaA ビーズと相互作用したタンパク質を溶出した。透析により溶出液を PBS にバッファー交換し、AG ガム (第一工業製薬、京都) を用いて約 1/5 に濃縮した。

未反応液、洗浄液、溶出液に含まれるタンパク質を SDS-PAGE 法で分離した。泳動後のゲルは 2D-銀染色試薬 II (コスモバイオ、東京) を用いて銀染色した。また、ウエスタンブロット法にて SpaA タンパク質の混入を確認した。SDS-PAGE 法で溶出液を泳動後、PVDF 膜 (Immobilon-P ; Millipore) に転写し、1%スキムミルク加 PBS でブロッキングした。一次抗体として抗 SpaA 家兔血清を、二次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG + IgM + IgA 重鎖抗体 (Zymed Laboratories) をそれぞれ室温で 60 分間反応させ、洗浄後 DAB 溶液により可視化した。

5. LC-MS/MS によるタンパク質の同定

SDS-PAGE 法で泳動したゲルからバンドを切り出し、LC-MS/MS 解析によりタンパク質の同定を行った。目的のタンパク質を含むサンプルを trypsin によりペプチド断片に消化し、それを逆相高速液体クロマトグラフィー (Paradigm MS2 ; Michrom BioResoueces, CA, USA) により分離、濃縮し、質量分析計 (Q-Tof2 ; Waters Micromass, MA, USA) で検出した。質量分析計により得られた質量およびアルゴンガスとの衝突で得られたフラ

グメントイオンのスペクトルをデータベース検索 (Mascot Server ; Matrix Science、MA、USA) し、サンプルに含まれるタンパク質を同定した。

6. 豚丹毒菌感染における PECs アクチン線維の動態解析

チャンバースライド上に PECs をコンフルエントの状態まで培養し、 5.0×10^5 cfu/well の藤沢株、PCho 欠損変異株 clone 100 または clone 112 を DMEM-FCS に懸濁し感染させた。感染後 1 時間および 4 時間に細胞を洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 4°C 10 分間固定した。付着した豚丹毒菌は一次抗体として抗豚丹毒菌家兎血清、二次抗体として Alexa Fluor® 546 標識抗ウサギ IgG (Invitrogen) をそれぞれ 37°C で 60 分間反応させ染色した。PECs のアクチン線維は Alexa Fluor® 488 標識 phalloidin (Invitrogen) を用いて室温で 20 分間染色した。染色標本は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5 ; Leica) を用いて観察した。

結果

1. PECs タンパク質と rSpaA ビーズとの相互作用

PECs から抽出したタンパク質溶液から、rSpaA と相互作用するタンパク質をプルダウン法により溶出した。溶出液を SDS-PAGE で展開し銀染色を行った結果、約 80 kDa、約 45 kDa の位置に明瞭な 2 本のバンドが確認された (図 4-1A: 矢印)。抗 SpaA 家兔血清によるウェスタンブロット法により、80 kDa 付近のバンドはビーズから脱落した SpaA タンパク質であることを確認した (図 4-1B)。

2. LC-MS/MS 法によるタンパク質の同定

45 kDa 付近のバンドをゲルから切り出し、LC-MS/MS 法によりバンドに含まれるタンパク質の同定を試みた。サンプルに含まれるタンパク質をペプチドに分解し、LC-MS/MS 分析で得られたすべてのペプチドのプロダクトイオン測定データを MASCOT サーバーを用いて NCBI nr のデータベースから検索した。その結果、有意なスコア ($p < 0.05$; スコア > 57) を示す豚のタンパク質 2 種類 (cytoskeletal beta actin, partial; β -アクチン、および Y box binding protein 1; YB-1) が同定された (図 2)。

3. 豚丹毒菌感染における PECs アクチン線維の動態解析

プルダウン法による相互作用解析によって SpaA タンパク質がアクチン結合タンパク質であることが示唆されたため、豚丹毒菌が感染した PECs のアクチン線維を可視化することで、その動態を調べた。その結果、藤沢株および表層に SpaA を欠く PCho 欠損変異株が付着した PECs でアクチン線維の走行や構造には変化はみられなかった (図 4-3)。

考察

第三章の結果から、豚丹毒菌の菌体表層分子である SpaA タンパク質は PECs への付着に関与する付着因子であることがわかった。これを受けて、本章では SpaA タンパク質が結合する PECs 側の受容体の同定を試みた。プルダウン法により rSpaA タンパク質と相互作用する PECs のタンパク質を回収し、LC-MS/MS 法により解析した結果、 β -アクチンと YB-1 の二種類の候補タンパク質が同定された。

YB-1 は細胞質内、核内に局在し、DNA や mRNA、および様々なタンパク質と結合し、mRNA の転写、翻訳の制御や細胞増殖や分化など多様な細胞内プロセスに関与する [78]。また、 β -アクチンは細胞質内に局在し、細胞骨格の一つであるアクチン線維を構成するタンパク質で、全ての細胞に広く分布する。しかし、今回検出された YB-1 は、質量分析で検出したペプチドの coverage 率が低く、また、この蛋白質はアクチンと親和性を示す [78] ことから、SpaA タンパク質と相互作用する PECs タンパク質として YB-1 の役割は少ないと考えられた。今回の実験では SpaA タンパク質と結合する PECs タンパク質として β -アクチンが検出されたが、アクチン線維は、通常、細胞表面には存在しないことから、 β -アクチンが PECs 上の SpaA タンパク質と結合する受容体であるとは考えにくい。

本章で豚丹毒菌の付着に関わる PECs 細胞膜上の受容体を同定することができなかった要因として、SpaA タンパク質に対する受容体が糖鎖である可能性がある。糖鎖は糖脂質、糖タンパク質の残基として細胞表層に多量に存在しており、*E. coli*、*Streptococcus* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Neisseria* spp. など様々な細菌が糖鎖を受容体として粘膜上皮細胞と結合することが知られている [79]。さらに、これまでに、豚丹毒菌が産生するノイラミニダーゼが血管内皮細胞への付着に重要であるとの報告 [6] もあり、SpaA タンパク質はノイラミニダーゼによって脱シアル酸処理された糖鎖を認識する可能性も考えられた。加えて SpaA タンパク質は他のタンパク質と複合体を形成し、PECs への付着に間接的に関与して

いる可能性なども考えられる。今後、豚丹毒菌の付着因子とその受容体を探索するに当たり、SpaA 以外の CBPs である CbpA、CbpB を含む他の表層タンパク質に関して、より詳細な解析が必要と考えられる。

本章で得られた結果から、豚丹毒菌 SpaA タンパク質はアクチン結合タンパク質である可能性が示唆された。アクチン線維は種々の細菌の細胞接着、細胞内への侵入、細胞内での移動に関与することが知られている。例えば、*Salmonella* spp. はⅢ型分泌装置によって細胞内に様々なエフェクターを注入し、アクチン骨格の再構成を誘導して細胞内に侵入する[80,81]。また、*Listeria monocytogenes* は菌体後方の一極にアクチンを重合させ、それを足場に細胞内を移動する[82]。腸管病原性大腸菌は腸上皮細胞膜下にアクチン線維が集合した台状突起形成を誘導、菌体を細胞と密着させる[83]。これらの細菌と同様、豚丹毒菌の SpaA タンパク質が宿主細胞のアクチン線維に作用して感染を促進させる可能性がある。しかし本章の実験においては、豚丹毒菌を感染させた PECs のアクチン線維には、SpaA タンパク質の有無にかかわらず、付着した菌体周囲に集合するなどの変化はみられなかった。このため、豚丹毒菌の PECs への付着にアクチン線維は無関係と考えられた。第三章および本章の実験で、豚丹毒菌が PECs の細胞質に積極的に侵入することを確認できなかった。しかし、豚丹毒菌の病原性として食細胞内寄生性が重要であることが報告されており[7]、また野外例では豚丹毒菌の血管内皮細胞内への侵入が観察されている[1]ので、SpaA タンパク質とアクチン線維との相互作用が豚丹毒菌の宿主細胞内での生残性や動態に関与している可能性はある。SpaA タンパク質のアクチン線維に対する結合の意義は今後の研究課題である。

要約

病原細菌の宿主細胞への付着は感染における重要なステップであり、付着因子と宿主細胞上の受容体の特異的な結合は、細菌の組織親和性を規定する。第三章で豚血管内皮細胞（PECs）への付着に関与する因子であることが確認された SpaA タンパク質に関して、PECs 側の受容体を特定することは、豚丹毒菌の血管親和性を理解するうえで非常に重要である。本章では、プルダウン法によってリコンビナント SpaA タンパク質と相互作用した PECs タンパク質を回収し、LC-MS/MS 法による同定を行った。その結果、SpaA タンパクと相互作用するタンパク質として β -アクチンと Y Box binding protein 1 を得た。しかし、どちらのタンパク質も細胞質内に局在するため SpaA タンパク質の受容体ではないと考えられた。また、種々の病原細菌は宿主細胞のアクチン線維を細胞への感染に利用しているが、豚丹毒菌が付着した PECs のアクチン線維に変化がみとめられなかったため、豚丹毒菌の PECs への付着にはアクチン線維の重合は無関係と考えられた。

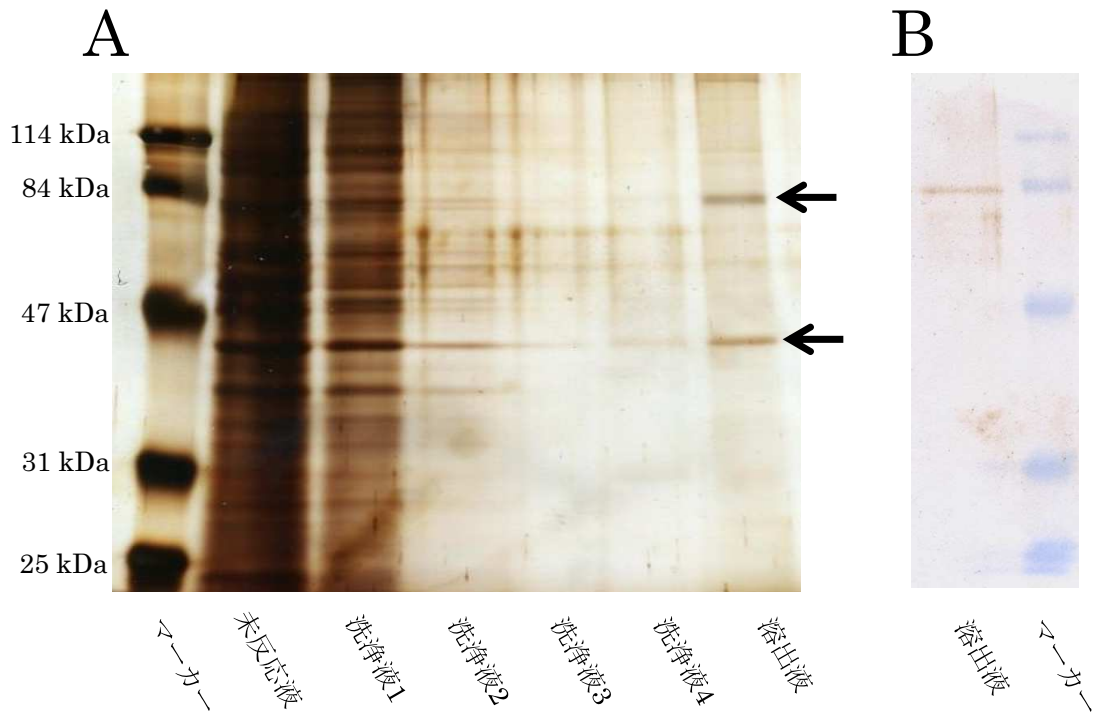


図4-1. プルダウン法によるタンパク質相互作用解析
 A SDS-PAGE法。銀染色。
 B 溶出液の抗SpaA家兎血清によるウエスタンブロット解析。

タンパク質名	NCBI nr ID	分子量 (kDa)	スコア	Coverage率	
cytoskeletal beta actin	gi 45269029	44.763	925	50%	
1	AETASTPPAQ	APRPCRSafa	AGLHRYQFAM	DDDIAALVVD	NGSGMCKAGF
51	AGDDAPRAVF	PSIVGRPRHQ	GVMVGMGQKD	SYVGDEAQSK	RGILTLKYPI
101	EHGIVTNWDD	MEKIWHHTFY	NELRVAPPEH	PVLLTEAPLN	PKANREKMTQ
151	IMFETFNTPA	MYVAIQAVLS	LYASGRTTGI	VMDSGDGVTH	TVPIYEGYAL
201	PHAILRLDLA	GRDLTDYLMK	ILTERGYSFT	TTAEREIVRD	IKEKLCYVAL
251	DFEQEMATAA	SSSSLEKSYE	LPDGQVITIG	NERFRCPEAL	FQPSFLGMES
301	CGIHETTFNS	IMKCDVDIRK	DLYANTVLSG	GTTMYPGIAD	RMQKEITALA
351	PSTMKIKIIA	PPERKYSVWI	GGILASLST	FQQMWISKQE	YDESGPSIVH
401	RKCF				
Y box binding protein 1	gi 354549569	25.258	66	8%	
1	GGDKKVIATK	VLGTVKWFNV	RNGYGFINRN	DTKEDVVFHQ	TAIKKNNPRK
51	YLRVSGDGET	VEFDVVEGK	GAEAAANTGP	GGVPVQGSKY	AADRNYHRRY
101	PRRRGPPRNY	QQNYQNSESG	EKNEGSESAP	EGQAQRRPY	RRRRFPPYYM
151	RRPYGRRPQY	SNPPVQGEVM	EGADNQGAGE	QGRPVRQNVY	RGYRPRFRRG
201	PPRQRQPRED	GNEEDKENQG			

図4-2. LC-MS/MS解析によって検出されたペプチドに関するMASCOT検索結果有意スコア (> 57) が得られた豚のタンパク質。赤字は検出されたペプチド配列。

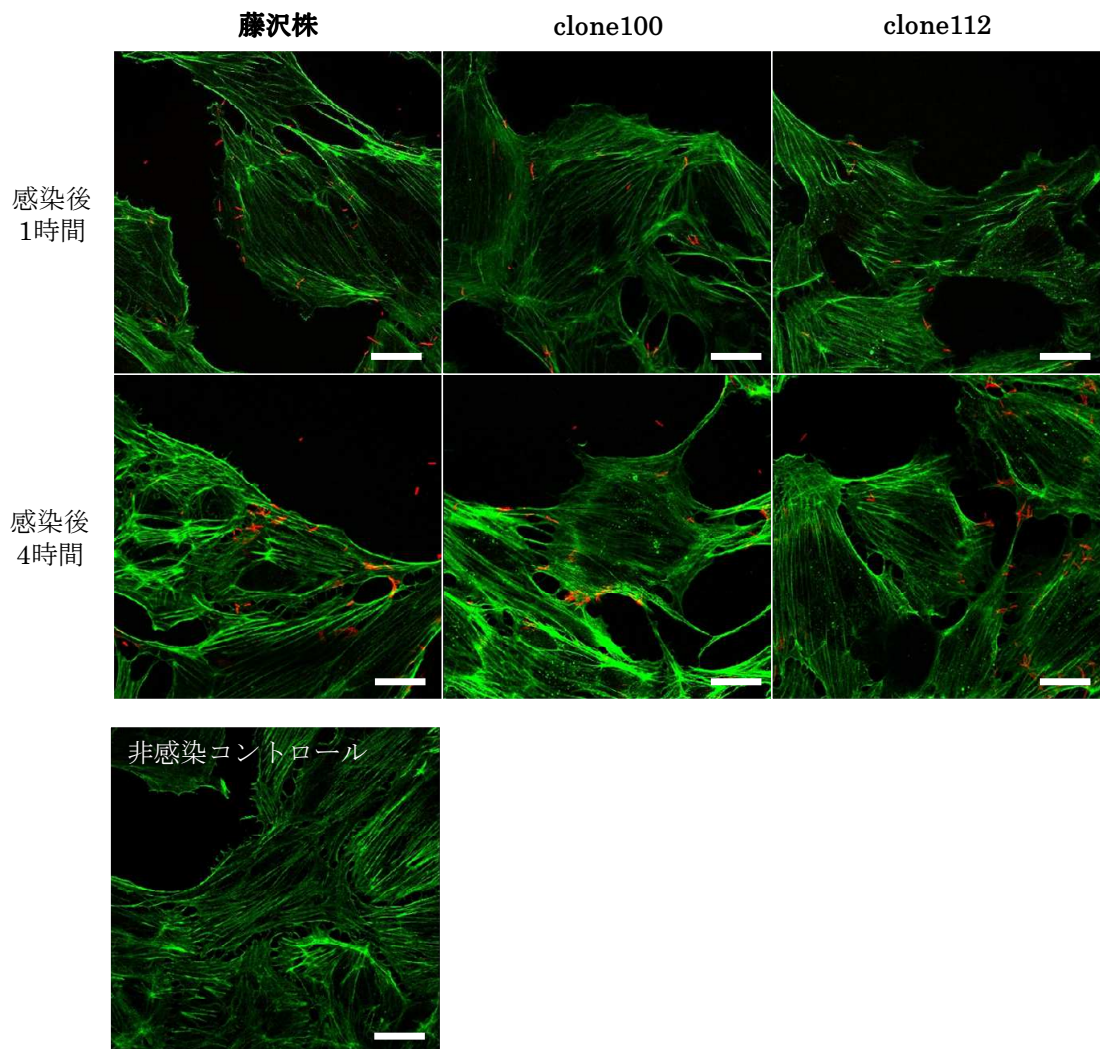


図4-3. 豚丹毒菌が感染したPECsのアクチン線維
 アクチン線維（緑）、豚丹毒菌（赤）。Scale bar = 20 μ m。

プライマー名	配列
BamH1-spaA_F	5'-CGGGATCCGATTCGACAGATATTTCTGTGA-3'
Hind3-spaA_R	5'-CCCAAGCTTCTATTTTAAACTTCCATCGTT-3'

下線部は制限酵素部位

表4-1. SpaA遺伝子のクローニングに用いたプライマー

総括

本研究は、豚丹毒菌の豚体内への侵入経路の解明と組織親和性、特に血管に対する親和性を規定する分子機構の解明を目的とし、豚丹毒菌感染豚の病理学的解析および豚丹毒菌体表層の付着因子を遺伝学的、生化学的、細菌学的に検討し、以下のような成果を得た。

第一章では、豚丹毒菌の豚体内への侵入経路に関する検索を行った。豚丹毒菌は扁桃に常在する傾向にあり、また、経口的に感染させるとすみやかに扁桃などの粘膜関連リンパ組織に移行する。これらのことから、豚丹毒菌の侵入門戸として扁桃に着目し、無菌子豚を用いた感染実験を実施し、口蓋帆扁桃を病理組織学的に検索した。その結果、扁桃組織から多数の菌が、また、血液や関節液からも少数の菌が分離された。このことから豚丹毒菌は扁桃に定着し、一部の菌は全身に移行することが明らかとなった。組織学的には、扁桃陰窩腔内に多数の菌が観察され、一部の菌は陰窩上皮内や実質のマクロファージ内に散見された。豚のパイエル板 M 細胞のマーカーである CK 18 に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的解析により、扁桃陰窩上皮には CK 18 陽性細胞が散在することがわかった。さらに、二重蛍光染色により CK 18 陽性細胞内に豚丹毒菌抗原が確認された。透過型電子顕微鏡観察の結果、菌体を細胞質に含む上皮細胞と、その直下で菌を受け取るマクロファージが観察されたが、同上皮細胞には微絨毛や microfold などの M 細胞の特徴はみとめられなかった。これらの結果から、扁桃陰窩腔が豚丹毒菌の持続感染の場であり、扁桃陰窩上皮に存在する CK 18 陽性細胞が豚丹毒菌の侵入門戸となることが明らかとなった。

第二章では、豚丹毒菌の宿主細胞に対する新たな付着因子として PCho に着目して検索を行った。PCho は様々な細菌の菌体表層構造物を修飾する病原因子であり、PCho 残基の生合成には *lic* 遺伝子群が関与している。豚丹毒菌藤沢株のゲノム解析により、豚丹

毒菌の *lic* 遺伝子群は莢膜多糖合成に関連する *cps* 遺伝子群の直下流にタンデムに存在することがわかった。このことから豚丹毒菌の菌体表層において PCho と莢膜多糖の生合成が関連することが予想された。そのため、豚丹毒菌莢膜多糖と PCho に関して、遺伝学的、生化学的解析を行った。その結果、*cps* 遺伝子群と *lic* 遺伝子群はオペロンを形成していた。精製した豚丹毒菌莢膜多糖は抗 PCho 抗体と反応する抗原を含んでおり、ゲノム解析から予想された通り、豚丹毒菌莢膜多糖は PCho により修飾されていることが明らかとなった。さらに、*lic* 遺伝子領域へのトランスポゾン挿入によって PCho 欠損変異株を作製することができた。このことから、PCho は豚丹毒菌の生存には必須ではないことがわかった。また、PCho 欠損変異株では、SDS-PAGE による莢膜多糖抗原の移動度に変化がみとめられたため、PCho は莢膜多糖の構造維持に関与することが示唆された。さらに、PCho 欠損変異株はマウスおよび豚に対する病原性が大きく低下していた。これらの結果から、豚丹毒菌の莢膜多糖は PCho で修飾されており、PCho 残基は豚丹毒菌の病原性に重要であることが明らかとなった。

第三章では、豚丹毒菌莢膜多糖の PCho 残基の病原性発現機序として、血管内皮細胞への付着を検討した。急性型豚丹毒では全身の中小血管に血栓、菌塞栓、内皮傷害を伴う血管炎などの血管病変が観察される。そのため、血管内皮細胞は豚丹毒菌の主要な標的細胞であると予想される。病原細菌の菌体表層に存在する PCho 残基は、宿主の血管内皮細胞や上皮細胞などに発現する PAFR を認識して結合し、細胞への付着に関与している。第二章で豚丹毒菌莢膜多糖は PCho で修飾されていること、および PCho 欠損変異株の病原性が低下することが明らかとなった。PCho 残基が豚丹毒菌の血管内皮細胞への付着に果たす役割を明らかにするため、PECs を用いて *in vitro* での付着試験を行った。その結果、PCho 欠損変異株は野生株と比較し PECs への付着能が低下しており、PCho 残基は PECs への付着に重要であることが示された。しかし、アンタゴニストによる付着阻害試験や PAFR 過剰発現細胞を用いた付着試験の結果から、豚丹毒菌の PECs への付着には PAFR

を介していないことが示唆された。一方、豚丹毒菌の SpaA タンパク質は PCho 残基に結合するコリン結合タンパク質であり、抗 SpaA タンパク質抗体処理により豚丹毒菌の PECs への付着が阻害された。これらの結果から、豚丹毒菌の PECs への付着は、他の病原細菌とは異なり、PCho 残基と PAFR との直接作用による付着ではなく、SpaA タンパク質を介することが明らかとなった。

第四章では、豚丹毒菌 SpaA タンパク質と結合する PECs 上の受容体を探索した。病原細菌の宿主細胞への付着は感染において重要なステップであり、付着因子と宿主細胞上の受容体の特異的な結合は、細菌の組織親和性を規定する。第三章で PECs への付着に関与する付着因子であることがわかった SpaA タンパク質に関して、PECs 側の受容体を特定することは豚丹毒菌の血管への親和性を理解するうえで非常に重要となる。プルダウン法によってリコンビナント SpaA タンパク質と相互作用を示した PECs タンパク質を回収し、LC-MS/MS 法による同定を行った。その結果、SpaA タンパクと相互作用するタンパク質としてβ-アクチンと Y Box binding protein 1 を得た。しかし、どちらのタンパク質も細胞質内に局在するため SpaA タンパク質の受容体ではないと考えられた。また、種々の病原細菌は宿主細胞のアクチン線維を細胞への感染に利用しているが、豚丹毒菌が付着した PECs ではアクチン線維に変化がみとめられなかったことから、豚丹毒菌の PECs への付着にはアクチン線維の重合は無関係と考えられた。

以上の結果より、豚丹毒菌の体内への侵入経路として、扁桃陰窩上皮に存在する CK 18 陽性細胞が侵入門戸となること、および豚丹毒菌莢膜多糖は PCho で修飾されており、PCho 残基は CBPs である SpaA タンパク質を介して豚丹毒菌の血管内皮細胞への付着に関与していることが明らかとなった。本研究では豚丹毒菌の血管内皮細胞への親和性を規定する宿主側の因子を明らかにすることはできなかったが、本研究で得られた一連の知見は、豚丹毒菌の感染経路や病原性に関わる詳細な分子機序解明の一助となると思われた。

謝辞

本研究に関して終始ご指導ご鞭撻いただきました、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 細菌寄生虫研究領域上席研究員 下地善弘 博士、東京大学農学生命科学研究科獣医病理学研究室 中山裕之 教授、内田和幸 准教授、ジェームズ・K・チェンバーズ 助教に心より敬意を表し深謝いたします。

また、本研究を進める上で様々な協力や助言を賜りました、動物衛生研究所の小川洋介 博士、江口正浩 博士、白岩和真 氏、施芳 博士、佐藤真澄 博士、芝原友幸 博士、東京大学獣医病理学研究室の皆様にご感謝いたします。

参考文献

1. Arends JP, Hartwig N, Rudolph M, Zanen HC: Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. *J Clin Microbiol* **20**:945-947, 1984.
2. Opriessnig T, Wood RL. Erysipelas. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional; 750-759, 2012
3. Stephenson EH, Berman DT: Isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from tonsils of apparently normal swine by two methods. *Am J Vet Res* **39**:187-188, 1978.
4. Wood RL. Erysipelas. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ, eds. *Diseases of swine*. 8th ed. Ames: Iowa State University Press; 419-430, 1999.
5. Ogawa Y, Oishi E, Muneta Y, Sano A, Hikono H, Shibahara T, Yagi Y, Shimoji Y: Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine* **27**:4543-4550, 2009.
6. Wang Q, Chang BJ, Riley TV: *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol* **140**:405-417, 2010.
7. Nakato H, Shinomiya K, Mikawa H: Adhesion of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to cultured rat aortic endothelial cells. Role of bacterial neuraminidase in the induction of arteritis. *Pathol Res Pract* **182**:255-260, 1987.
8. Shimoji Y, Yokomizo Y, Sekizaki T, Mori Y, Kubo M: Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infect Immun* **62**: 2806-2810, 1994.
9. Shimoji Y, Ogawa Y, Osaki M, Kabeya H, Maruyama S, Mikami T, Sekizaki T: Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene,

- fibronectin, and type I and IV collagens. *J Bacteriol* 185:2739-2748, 2003.
10. Casteleyn C, Breugelmans S, Simoens P, Broeck WV: The Tonsils Revisited: Review of the Anatomical Localization and Histological Characteristics of the Tonsils of Domestic and Laboratory Animals. *Clin Dev Immunol* doi:10.1155/2011/472460, 2011.
 11. Fedorka-Cray PJ, Kelley LC, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA: Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. *Infect Immun* 63:2658-2664, 1995.
 12. Chiers K, Donne E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F: *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Vet Microbiol* 85:343-352, 2002.
 13. Horter DC, Yoon KJ, Zimmerman JJ: A review of porcine tonsils in immunity and disease. *Anim Health Res Rev* 4:143-155, 2003.
 14. MacInnes JI, Gottschalk M, Lone AG, Metcalf DS, Ojha S, Rosendal T, Watson SB, Friendship RM: Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res* 72:242-248, 2008.
 15. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH: Microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *Vet Microbiol* 147:346-357, 2011.
 16. Conklin RH, Steele JH. Erysipelothrix infections. In: Steele JH ed. *CRC Handbook. Series in Zoonoses, vol. 1 (section A)*. Boca Raton: CRC Press: 327-337, 1979.
 17. Kohbata S, Yokobata H, Yabuuchi E: Cytopathogenic effect of *Salmonella* Typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol Immunol* 30:1225-1237, 1986.
 18. Jones BD, Ghori N, Falkow S: *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's

- patches. *J Exp Med* 180:15-23, 1994.
19. Owen RL, Pierce NF, Apple RT, Cray WCJ: M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for transepithelial migration. *J Infect Dis* 153:1108-1118, 1986.
 20. Grutzkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO: Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 3:1011-1015, 1990.
 21. Walker RI, Schauder-Chock EA, Parker JL: Selective association and transport of *Campylobacter jejuni* through M cells of rabbit peyer's patches. *Can J Microbiol* 34:1142-1147, 1988.
 22. Gebert A, Rothkötter HJ, Pabst R: Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Res* 276:213-221, 1994.
 23. Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP: The role of M cells in mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 57:323-332, 2000.
 24. Kraehenbuhl JP, Neutra MR: Epithelial M Cells: Differentiation and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:301-332, 2000.
 25. Sansonetti PJ, Phalipon A: M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: Mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* 11:193-203, 1999.
 26. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP: Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86:345-348, 1996.
 27. Gebert A, Pabst R: M cells at locations outside the gut. *Semin Immunol* 11:165-170, 1999.
 28. Belz GT, Heath TJ: Tonsils of the Soft Palate of Young Pigs: Crypt Structure and Lymphoepithelium. *Anat Rec* 245:102-113, 1996.

29. Kumar P, Timoney JF: Light and Electron Microscope Studies on the Nasopharynx and Nasopharyngeal Tonsil of the Horse. *Anat Histol Embryol* 30:77-84, 2001.
30. Fujimura Y: Evidence of M cells as portals of entry for antigens in the nasopharyngeal lymphoid tissue of humans. *Virchows Arch* 436:560-566, 2000.
31. Koshi R, Mustafa Y, Perry ME: Vimentin, cytokeratin 8 and cytokeratin 18 are not specific markers for M-cells in human palatine tonsils. *J Anat* 199:663-674, 2001.
32. Gebert A: Identification of M-cells in the rabbit tonsil by vimentin immunohistochemistry and in vivo protein transport. *Histochem Cell Biol* 104:211-220, 1995.
33. Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Booth TA, Hirst BH: Differential expression of lectin-binding sites defines mouse intestinal M-cells. *J Histochem Cytochem* 41:1679-1687, 1993.
34. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Yabashi A, Waguri S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Iimura M, Hamura K, Fukuoka S, Lowe AW, Itoh K, Kiyono H, Ohno H: Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462:226-230, 2009.
35. Shimoji Y, Yokomizo Y, Mori Y: Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. *Infect Immun* 64:1789-1793, 1996.
36. Mosser JL, Tomasz A: Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem* 245:287-298, 1970.
37. Weiser JN, Shchepetov M, Chong ST: Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 65:943-950, 1997.
38. Weiser JN, Goldberg JB, Pan N, Wilson L, Virji M: The phosphorylcholine epitope

- undergoes phase variation on a 43-kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **66**:4263-4267, 1998.
39. Howard MD, Cox AD, Weiser JN, Schurig GG, Inzana TJ: Antigenic diversity of *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide: phase-variable accessibility of the phosphorylcholine epitope. *J Clin Microbiol* **38**:4412-4419, 2000.
 40. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI: *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**:435-438, 1995.
 41. Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg Ii K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, Gibson BW, Apicella MA: Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* **37**:13-27, 2000.
 42. Fischer W: Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res Microbiol* **151**:421-427, 2000.
 43. Baur S, Marles-Wright J, Buckenmaier S, Lewis RJ, Vollmer W: Synthesis of CDP-activated ribitol for teichoic acid precursors in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **191**:1200-1210, 2009.
 44. Clark SE, Weiser JN: Microbial modulation of host immunity with the small molecule phosphorylcholine. *Infect Immun* **81**:392-401, 2013.
 45. Zhang JR, Idanpaan-Heikkila I, Fischer W, Tuomanen EI: Pneumococcal licD2 gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol Microbiol* **31**:1477-1488, 1999.
 46. Ogawa Y, Ooka T, Shi F, Ogura Y, Nakayama K, Hayashi T, Shimoji Y: The Genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of Firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J Bacteriol* **193**:2959-2971, 2011.

47. Shimoji Y, Asato H, Sekizaki T, Mori Y, Yokomizo Y: Hyaluronidase is not essential for the lethality of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice. *J Vet Med Sci* 64:173-176, 2002.
48. Casal J, Jado I, Fenoll A, Perez A, Toraño A. Periodate oxidation of R36A pneumococci greatly enhances production of hybridomas secreting anti-protein antibodies. *Microb Pathog* 24:111-116, 1998.
49. Nagahama M, Nakayama T, Michiue K, Sakurai J: Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities. *Infect Immun* 65:3489 -3492, 1997.
50. Cao M, Bitar AP, Marquis H: A mariner-based transposition system for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 73:2758-2761, 2007.
51. Tomasz A: Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of Pneumococcus: chanin formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 59:86-93, 1968.
52. Lachmann PG, Deicher H: Solubilization and characterization of surface antigenic components of *Erysipelothrix rhusiopathiae* T28. *Infect Immun* 52:818-822, 1986.
53. Hakenbeck R, Madhour A, Denapaite D, Brückner R. Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol Rev* 33:572-586, 2009.
54. Yother J, Leopold K, White J, Fischer W: Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *J Bacteriol* 180:2093-2101, 1998.
55. Damjanovic M, Kharat AS, Eberhardt A, Tomasz A, Vollmer W: The essential tacF gene is responsible for the choline-dependent growth phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 189:7105-7111, 2007.
56. González A, Llull D, Morales M, García P, García E: Mutations in the tacF gene of

clinical strains and laboratory transformants of *Streptococcus pneumoniae*: impact on choline auxotrophy and growth rate. *J Bacteriol* 190:4129-4138, 2008.

57. Takahashi T, Takagi M, Sawada T, Seto K: Cross protection in mice and swine immunized with live erysipelas vaccine to challenge exposure with strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* of various serotypes. *Am J Vet Res* 45:2115-2118, 1984.
58. Imada Y, Goji N, Ishikawa H, Kishima M, Sekizaki T: Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infect Immun* 67:4376-4382, 1999.
59. Sawada T, Takahashi T, Seto K: Immunogenicity of different fractions from broth culture of an attenuated strain of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in mice and swine. *日本獣醫學雑誌*49:151-154, 1987.
60. Sawada T, Takahashi T: Cross protection of mice and swine inoculated with culture filtrate of attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* and challenge exposed to strains of various serovars. *Am J Vet Res* 48:239-242, 1987.
61. Weiser JN, Pan N, McGowan KL, Musher D, Martin A, Richards J: Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med* 187:631-640, 1998.
62. Fernández-Tornero C, García E, López R, Giménez-Gallego G, Romero A: Two new crystal forms of the cholinebinding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J Mol Biol* 321:163-173, 2002.
63. Fernández-Tornero C, López R, García E, Giménez-Gallego G, Romero A: A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Biol* 8:1020-1024, 2001.
64. Makino S, Yamamoto K, Murakami S, Shirahata T, Uemura K, Sawada T, Wakamoto H, Morita H: Properties of repeat domain found in a novel protective

- antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microb Pathog* 25:101-109, 1998.
65. Shimoji Y, Mori Y, Fischetti VA: Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity. *Infect Immun* 67:1646-1651, 1999.
 66. Yang W, Diehl JR, Roudebush WE: Comparison of the coding sequence of the platelet-activating factor receptor gene in three species. *DNA Seq* 12:239-251, 2001.
 67. Ishii S, Matsuda Y, Nakamura M, Waga I, Kume K, Izumi T, Shimizu T: A murine platelet-activating factor receptor gene: cloning, chromosomal localization and up-regulation of expression by lipopolysaccharide in peritoneal resident macrophages. *Biochem J* 314:671-678, 1996.
 68. Serino L, Virji M: Genetic and functional analysis of the phosphorylcholine moiety of commensal *Neisseria* lipopolysaccharide. *Mol Microbiol* 43:437-448, 2002.
 69. Barbier M, Oliver A, Rao J, Hanna SL, Goldberg JB, Albertí S: Novel phosphorylcholine-containing protein of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection isolates interacts with airway epithelial cells. *J Infect Dis* 197:465-473, 2008.
 70. Honda Z, Ishii S, Shimizu T: Platelet-activating factor receptor. *J Biochem* 131:773-779, 2002.
 71. Rijneveld AW, Weijer S, Florquin S, Speelman P, Shimizu T, Ishii S, van der Poll T: Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J Infect Dis* 189:711-716, 2004.
 72. Tyrer P, Foxwell AR, Cripps AW, Apicella MA, Kyd JM: Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium. *Infect Immun* 74:625-631, 2006.
 73. Kline KA, Falker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B: Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host Microbe* 5:580-592, 2009.
 74. Oshida T, Sugai M, Komatsuzame H, Hong YM, Suginaka H, Tomasz A: A

- Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:285-289, 1995.
75. Sanchez-Beato AR, Ronda C, Garcia JL: Tracking the Evolution of the Bacterial Choline-Binding Domain: Molecular Characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 cspA Gene. *J Bacteriol* **177**:1098-1103, 1995.
76. Braun L, Dramsi S, Dehoux P, Bierne H, Lindahl G, Cossart P: InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* **25**:285-294, 1997.
77. Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS: SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* **25**:1113-1124, 1997.
78. Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP, Lyabin DN: Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)* **76**:1402-1433, 2011.
79. Sharon N: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta* **1760**:527-537, 2006.
80. Chang J, Chen J, Zhou D: Delineation and characterization of the actin nucleation and effector translocation activities of *Salmonella* SipC. *Mol Microbiol* **55**:1379-1389, 2005.
81. Zhou D, Mooseker MS, Galan JE: Role of the *S. Typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**:2092-2095, 1999.
82. Stevens JM, Galyov EE, Stevens MP: Actin dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**:91-101, 2006.
83. Campellone KG, Leong JM: Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr Opin Microbiol* **6**:82-90, 2003.