大腸菌が産生する下痢原因毒素の研究

竹 田 美 文

国立感染症研究所
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

〔受理：1999年2月22日〕

下痢を起こす大腸菌のうち、毒素原性大腸菌と腸管出血性大腸菌について、それぞれが産生する下痢原因毒素の研究を行い、以下の成果を得た。

1. 毒素原性大腸菌が産生する易熱性エンテロトキシン (LT) に、LTh と LTp の2種類の分子種が存在することを明らかにした。

2. 毒素原性大腸菌が産生する耐熱性エンテロトキシン (ST) に、STh と STp の2種類の分子種が存在することを明らかにした。

3. ST の構造と生物活性の相関を調べ、ST の生物活性発現に必須のペプチドを同定した。

4. 腸管出血性大腸菌が産生する Vero 毒素 (VT, Stx) について、Stx1 の1次構造が志賀毒素の1次構造と同一であることを示した。

5. Stx1 と生物活性は類似しているが、免疫学的現状が異なる Stx2 の存在を見出し、Stx2 の1次構造を明らかにした。

6. Stx1, Stx2 とともに変異毒素が存在することを明らかにし、Stx1 については1種類、Stx2 については4種類の変異毒素の存在を証明した。

7. 志賀毒素群毒素 (赤痢菌が産生する志賀毒素および腸管出血性大腸菌が産生する Vero 毒素) の作用機作が、真核細胞の60Sリボソーム亜粒子を構成している28Sリボソーム RNA の5'末端から4,324番目のアデノシンのN-グリコシド結合を加水分解するRNA N-グリコシダーゼであることを証明し、志賀毒素群毒素の真核細胞の蛋白合成阻害は、上記酵素活性に基づく1分子のアデニンの遊離により、60Sリボソーム亜粒子へのEF-1 依存アミノアシル tRNA 結合が阻害されることを示した。

8. 志賀毒素群毒素の酵素活性中心を同定し、活性中心部位を構成するアミノ酸をコードする塩基の部位特異変異法による置換により、無毒変異毒素を調製した。そのうち、A サブユニットのN末端から167番目のグルタミン酸をグルタミンに、170番目のアルギニンをロイシンに置換した無毒変異毒素 (E167Q-R170L) の毒性は、限りなく低く、トキシドワクチンとして利用できる可能性を示唆した。

1. は じ め に

下痢を起こす大腸菌として、現在までに、Enteropathogenic *Escherichia coli* (腸管病原性大腸菌), Enteroinvasive *E. coli* (細胞侵入性大腸菌), Enterotoxigenic *E. coli* (毒素原性大腸菌), Enterohemorrhagic *E. coli* (腸管出血性大腸菌), Enteroaggregative *E. coli* (腸管凝集性大腸菌) の5種類が報告されている。

それぞれの大腸菌は、下痢を起こす機構が全く異なっていることがわかっている。このうち、毒素原性大腸菌と腸管出血性大腸菌について、下痢原因毒素としての蛋白毒素を研究の対象とし、以下に述べる成果を挙げた。

2. 毒素原性大腸菌が産生する易熱性エンテロトキシン(LT)に関する研究

1) 毒素原性大腸菌

毒素原性大腸菌は、1956年に、インドの De が最初に報告した(10)。すなわち、コレラ菌が分離できないがコレラ様症状を呈している患者から分離した大腸菌が、ウサギの結紮腸管テストで液体貯留を起こすことを見出した。当時報告されていた病原性大腸菌(*enteropathogenic Escherichia coli*)ではこのような反応が起こらないので、分離した大腸菌を新しい下痢原性大腸菌と考えた。13年後、Sack ら(57)はこの成績を確認するとともに、菌の培養上清がウサギの結紮腸管に液体貯留を起こすこと、しかもその活性が易熱性、非透析性で、40%飽和硫酸によって沈殿し、ウサギに免疫すると抗体を生ずることから、コレラ毒素に似ているエンテロトキシンと考え、この群の大腸菌を毒素原性大腸菌(*enterotoxigenic E. coli*)と名づけた。

毒素原性大腸菌が下痢の原因菌として重要であることが、まもなく続々と報告されるようになった。なかでも、Merson ら(38)が、熱帯や亜熱帯への旅行者がしばしば罹患する旅行者下痢症の原因菌として毒素原性大腸菌が重要であることを明らかにしたことが、毒素原性大腸菌が大きく注目されるようになるきっかけとなった。すなわち、Merson ら(38)は、1974年10月、メキシコ市で開かれたある国際医学会に出席した73名の医

師と48名の家族に同行して、旅行中はもちろん、旅行前から旅行後に至るまで、下痢の有無と下痢の原因菌などを詳細に調べた。その結果、下痢原因菌検索を行った107名のうち51名が旅行者下痢症に罹患し、そのうち23名(45.1%)から毒素原性大腸菌を分離した。

わが国においても、毒素原性大腸菌による集団下痢症が、1974年以降、相当数報告されている(33)。われわれが大阪空港検疫所と共同で行った旅行者下痢症の下痢原因菌検索においても、毒素原性大腸菌がもっとも頻度高く分離されている(1)。

毒素原性大腸菌が下痢の原因となる毒素を産生することは、Sack ら(57)が命名した名前の由来からも明らかなように、早くからわかっていた。Sack ら(57)の報告とほぼ同じ頃、Smith と Gyles (64)は、ブタの下痢原因菌である大腸菌が易熱性エンテロトキシン(heat-labile enterotoxin, LT)と耐熱性エンテロトキシン(heat-stable enterotoxin, ST)とを産生することを発表していて、この報告が、毒素原性大腸菌がLTとSTの2種類のエンテロトキシンを産生することを報じた最初の報告である。LTは60°C、10分の加熱によって活性を失う蛋白毒素で、STは100°C、10分の加熱によっても失活しないペプチド毒素である。以下に、LTとSTについてわれわれが行った研究成果の概略を述べる。

2) LTにはLThとLTpの2種類の分子種が存在する

LTには、ヒトの下痢原因菌が産生するLThと、ウシ、ブタ、ヒツジなどの家畜の下痢原因菌が産生するLTpの2種類の分子種がある(19, 20, 21, 74)。しかし、初期の頃のLTの研究は、この事実を認識しないで行われていた。Moon ら(41), Kohler (31), Larivière ら(35), Jacks ら(26), Mitchell ら(39)がまずLTの部分精製を報告した。次いでDorner (12)は、ブタ由来のLTの高純度精製標品を得、分子量が102,000と報告した。これに対しFinkelstein ら(17)はヒト患者由来のLTを精製し、分子量が使用した菌株や培地の種類によって35,000~100,000と異なるとした。Dorner (12)とFinkelstein ら(17)が、ともにLTが1本鎖

のペプチドであると報告したのに対し、Schenkein ら (60) は、精製 LTh は分子量が 180,000~200,000 と大きい、分子量 68,000~70,000 と 14,000~15,000 の 2 つのサブユニットから構成されているとした。Evans ら (16), Takeda ら (73) も、分子量がそれぞれ 20,000 と 30,000 の LT の精製を報告した。

一方 Dallas と Falkow (9) は、LT 産生プラスミドを用いてミニセル系で合成した LT が、分子量 25,500 と 11,500 のサブユニットから構成されていることを証明した。LT がコレラ毒素と類似の大きさの A, B 両サブユニットから構成されていることを示した最初の報告である。

こうした情報を基にして、A, B サブユニットから成る LT の精製を最初に報告したのは、Clements と Finkelstein (8) および Kunkel と Robertson (34) である。特に Clements と Finkelstein (8) は、LT がアガロース A5m ゲルに吸着し、しかも吸着した LT が 0.2 M ガラクトースを含む緩衝液で溶出することを見出し、極めて簡便な LT の精製法を示した。

われわれは、Clements & Finkelstein (8) の簡便 LT 精製法を用いて LT の精製を始めたが、その過程で、ヒト患者由来の LT (LTh) とブタ由来の LT (LTp) とが免疫学的に同一の分子種ではないことを見出した (21)。すなわち、精製した LTh と LTp の抗体を用いたゲル内沈降反応において、両者の沈降線が spur をすることから、LT に 2 種類の分子種があると結論した。精製標品の物理化学的性状が両者で異なっていることも証明した (74)。

当時すでに、LT とコレラ毒素 (CT) が免疫学的に関連のある分子であることがわかっていたので、2 種類の LT と CT の性状を詳細に解析し、物理化学的性状が異なること (74)、しかも免疫学的には、お互いに関連性があるが同一でないことを証明した (70, 72)。

その後、CT, LTh, LTp それぞれについて、コードする遺伝子の塩基配列が決定され、3 種のエンテロトキシンの一次構造の類似性が明らかとなっている (72)。

3) 耐熱性エンテロトキシン (STI) には STh と STp の 2 種類の分子種がある。

毒素原性大腸菌が産生する ST は、大きく分けて 2 種類ある (5)。1 つはメタノール可溶性の STI (または STa) で、2~5 日齢の乳飲みマウスと 1~3 日齢の乳飲みブタに投与すると腸管内に液体貯留を引き起こす。もう 1 つはメタノールに不溶性の STII (または STb) で、7~9 週齢の幼若ブタで毒性を示すが、乳飲みマウスでは腸管内液体貯留を示さない。われわれは、この 2 種の ST のうち STI (または STa) について研究した。

研究の当初、STI に 2 種類の分子種があるということは認識されていなかった。まず 1978 年に Alderete と Robertson (3) が、ブタ由来の毒素原性大腸菌が産生する ST を精製し、分子量が約 5,000 であると報告した。一方、So と McCarthy (65) は、ウシ由来の STI をコードしている遺伝子の塩基配列を決定し、STI が 72 個のアミノ酸残基からなる蛋白質であることを明らかにした。

STI に 2 種類の分子種が存在することは、STI の構造決定を大阪大学蛋白質研究所の下西康嗣教授と共同で進めた結果明らかになった。まず Aimoto ら (2) はヒト由来の毒素原性大腸菌が産生する STI が 19 残基のアミノ酸残基から成ることを示した。次いで Takao ら (68) は、ブタ由来の毒素原性大腸菌が産生する STI の構成アミノ酸残基数が 18 箇であり、ヒト由来の毒素原性大腸菌が産生する STI の構成アミノ酸数より 1 残基少ないことを示し、両者が異なる分子種であることを明らかにした。

4) ST の構造と生物活性

ヒト由来の毒素原性大腸菌が産生する STI (STh) とブタ由来の毒素原性大腸菌が産生する STI (STp) の構造は極めて類似性が高かった (2, 68)。特に C 末端から 15 番目のタイロシンから C 末端のタイロシンまでの 15 残基のアミノ酸から成るペプチドは C 末端から 4 番目のアミノ酸を除いて同一であった。次いで Ikemura ら (24), Yoshimura ら (79) は、それぞれ STh, STp の化学合成を試み、天然 ST と同じ生物活性や物理化学的性状を持つ STh および STp の合

表 1. 化学合成した STh, STp およびそれぞれのアナログと生物活性*

アミノ酸配列	略 号	最小有効量 (ng/100 μ l)
Asn-Ser-Ser-Asn-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr ² -Gly-Cys-Tyr	STh (1-19)	0.8
Asn-Ser-Ser-Asn-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys	STh (1-18)	0.4
Ser-Ser-Asn-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr	STh (2-19)	0.8
Ser-Asn-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr	STh (3-19)	1.3
Asn-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr	STh (4-19)	1.1
Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr	STh (5-19)	0.8
Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys	STh (5-18)	0.5
Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr	STh (6-19)	0.6
Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys	STh (6-18)	0.6
Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr	STp (1-18)	1.0
Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys	STp (1-17)	1.3
Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr	STp (2-18)	0.5-2
Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr	STp (3-18)	1.5-2
Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr	STp (4-18)	0.8-1.0
Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys	STp (4-17)	1.2
Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr	STp (5-18)	0.8-1.0
Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys	STp (5-17)	0.7

* 生物活性は乳のみマウスの液体貯留活性で示した。

成に成功した。

天然 ST と同じ ST の化学合成が可能であることがわかったので、Yoshimura ら (78) は同様な方法で、STh および STp の短鋭アナログの合成を試み、表 1 に示した 8 種類の STh アナログおよび 7 種類の STp アナログを合成した。これらアナログは表 1 に示したようにすべてが天然 STh および STp とほぼ同じ生物活性を持つことがわかった。この成績から、STh と STp の活性発現に必須のペプチドは STh [6-18] および STp [5-17] の 13 残基のアミノ酸から成るペプチドであることが明らかとなった。

3. 腸管出血性大腸菌が産生する Vero 毒素の研究

1) 腸管出血性大腸菌

腸管出血性大腸菌は、1982年にアメリカのオレゴン州とミシガン州で発生したハンバーガー食中毒事件に際して、Riley ら (56) が分離し、広く注目を集めるようになった。わが国でも、1996年に、本菌による食中毒の爆発的大流行が

発生し、社会問題にまで発展した。

腸管出血性大腸菌の特徴は、Vero 細胞に対して強い細胞毒性を示す Vero 毒素 (VT) を産生することである。いいかえれば、VT を産生する大腸菌が腸管出血性大腸菌である。VT は、腸管出血性大腸菌感染症の際の血性下痢を主症状とする出血性大腸炎ばかりでなく、続発する溶血性尿毒症症候群や脳症の原因毒素であることがわかっている。

VT を最初に報告したのは Konowalchuk ら (32) で、彼らは下痢患者から分離した大腸菌の易熱性エンテロトキシン産生性を Vero 細胞を用いて調べていたところ、O18, O26, O68, O111, O138 などの特定の血清型の大腸菌が、Vero 細胞に対して致死的に働く物質を産生していることを見出し、これを Vero 毒素と呼んだ。この発見は、Wade ら (75), Scotland ら (61) によって確認されたが、当時大きい注目を集めるに至らなかった。

一方、長年 *Shigella dysenteriae* 1 が産生する志賀毒素の研究を行っていた O'Brien ら (45) は、

E. coli O26 が HeLa 細胞に細胞毒性を示す毒素を産生し、しかもこの毒素の活性が抗志賀毒素抗体で中和されることを見出し、この毒素を志賀毒素様毒素 (Shiga-like toxin) と名付けた (46)。さらに Riley ら (56) が発見した *E. coli* O157: H7 が志賀毒素様毒素を産生することを O'Brien らが (47), 細胞毒 (cytotoxin) を産生することを Johnson ら (30) が発見し、VT と志賀毒素様毒素が同一毒素であることがわかった。

こうした発見の経緯が理由で、長い間、同じ毒素を VT と志賀毒素様毒素という 2 つの名称で呼んでいたが、1996 年になって、赤痢菌が産生する志賀毒素と腸管出血性大腸菌が産生する VT (志賀毒素様毒素) を一括して Shiga toxin family とし、腸管出血性大腸菌 (または Vero 毒素産生性大腸菌) の呼称を志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin producing *E. coli*, STEC) と呼ぶよう提案が行われた (6)。また同時に、後に述べる 2 種類の Vero 毒素 (VT1 と VT2) それぞれも、Shiga toxin 1 (Stx1) と Shiga toxin 2 (Stx2) と呼ぶよう提案された。

2) Stx1 と志賀毒素の一次構造は同一である

Vero 毒素は、大きく分けて 2 種類の存在が明らかとなっている。すなわち、O'Brien ら (45) が最初に発見した VT1 (または Shiga-like toxin I) と、その後その存在が証明された VT2 (または Shiga-like toxin II) である。前述のように、現在ではそれぞれを Stx1, Stx2 と呼ぶことになっている。

Stx1 の精製は、まず O'Brien と Laveck (44) が、次いで、Noda ら (43) が報告した。精製 Stx1 は A および B の 2 つのサブユニットから構成されていて、A サブユニットは後に述べる酵素活性を担い、B サブユニットは細胞膜表面のレセプターとの結合を担う。Takao ら (69) は、*E. coli* O157: H7 から Noda ら (43) が精製した Stx1 のアミノ酸配列をエドマン分解法と FAB 質量分析法によって解析した。その結果、Stx1 の一次構造は志賀毒素の一次構造 (63, 66) と全く同一であることを明らかにした。

Stx1 をコードする構造遺伝子の塩基配列は、いくつかの研究グループによって報告されている (7, 11, 29, 69)。これらの成績のうち、われわ

れが報告した塩基配列 (69) から推定したアミノ酸配列は、志賀毒素のアミノ酸配列 (63, 66) と全く同一であるが、他の 3 つの研究グループの決定した塩基配列 (7, 11, 29) から推定したアミノ酸配列は、A サブユニットの N 末端から 45 番目のアミノ酸残基が志賀毒素と異なっている。

現在までに、数種類の Stx1 変異株が報告されている (49, 52, 53) が、Stx1 のプロトタイプは、志賀毒素と同一の一次構造を持つ毒素と考えられる。

3) Stx2 の発見とその性状

Scotland ら (62) は腸管出血性大腸菌が産生する VT の中に、従来報告されている VT とは異なり、志賀毒素の抗体で中和されない毒素が存在することを見出し、Stx 2 (VT2) として区別した。Strockbine ら (67) もこの事実を確認した。

一方、佐久ら (58) は、都内某病院に緊急入院した出血性大腸炎の患者から *E. coli* O157: H7 を分離した。わが国で、患者から直接腸管出血性大腸菌を分離した最初の例である。分離した J-2 株は Vero 細胞に対する致死活性毒素を産生することが確認できたものの、その活性が抗志賀毒素抗体で中和されないことがわかった (81) (図 1)。

Yutsudo ら (80) は、J-2 株の産生する抗志賀毒素抗体で中和されない VT を精製し、その性状を調べた。その結果、精製毒素は、Strockbine ら (67) の報告した毒素と免疫学的に同一で、志賀毒素や Stx1 (VT1) と同じように、A, B 2 つのサブユニットから構成されているが、両サブユニットの分子量は、志賀毒素や Stx1 の対応するサブユニットの分子量より大きいことがわかった。

Stx2 は、Stx1 と免疫学的性状が異なっている。例えばオクタロニーのゲル内沈降反応において、Stx2 と志賀毒素の間には共通抗原性が認められない (80)。しかしながら Stx2 の生物活性は、表 2 に示したように、志賀毒素や Stx1 と同じである。活性の強さは、マウスの腹腔内投与による致死活性が Stx1 の約 30 倍であるが、Vero 細胞に対する細胞毒性は Stx1 とほぼ同じであ

図1. 抗志賀毒素血清による VT1 および VT2 の Vero 細胞活性の中和

J-2 株培養上清 (VT1) と 82-2035 株培養上清 (VT2) の Vero 細胞毒性 (細胞が増殖していないのでウエルの中の培地の色が黄色) を希釈倍数の低い抗志賀毒素血清が中和して Vero 細胞が増殖し、ウエルの中の培地の色が赤変するかどうかを調べた実験。抗志賀毒素血清が VT1 の活性を中和するが、VT2 の活性は中和しないことが示されている。

る。

Stx2 の一次構造について、われわれは精製毒素のアミノ酸配列の解析と、毒素遺伝子の塩基配列からの推定によって決定した (42)。当初われわれの遺伝子の塩基配列の成績は、Jackson ら (28) が報告した成績と塩基数が 5 個異なっていた。しかしその後、Jackson ら (27) は彼らの成績が誤っていたことを認めた。

3) Stx の変異毒素

Oku ら (51) は、溶血性尿毒症症候群患者から分離した *E. coli* O91: H21 (B2F1 株) が、Stx2 と共通抗原性はあるが同一ではない Vero 毒素を産生することを見出し、これを精製した。精製毒素は Stx1 と共通抗原性が認められないことから、Stx2 の変異毒素と考えた。Stx2 変異毒素は、免疫学的性状が Stx1 や Stx2 と異なっ

ているばかりでなく、物理化学的性状も異なっていた。

次いで Ito ら (25) は、この新しい変異毒素の構造を明らかにすることを目的として、毒素遺伝子のクローニングを試みたところ、精製に用いた B2F1 株は 2 種類の変異毒素遺伝子を持っていることが明らかとなった。当時、すでにブタの浮腫病の原因菌が Stx2 に類似の変異毒素を産生することがわかっていたので、この変異毒素と異なることを確かめた上で、Ito ら (25) は Marques ら (37) が報告したブタの浮腫病の原因菌が産生する Stx2 を VT2vp, B2F1 株が産生する 2 種類の Stx2 変異毒素をそれぞれ VTvha, VTvhb と呼ぶことを提案した。

現在までに、Stx の変異毒素は Stx1, Stx2 ともに数種類ずつ報告されている (71, 77)。われわれは、そのうち Stx1 の 1 種類 (49) と Stx2 の 4 種類 (25, 36) の存在を証明した。

4) 志賀毒素群毒素の作用機作

志賀毒素が真核細胞の 60S リボソーム亜粒子に作用して、蛋白合成を阻害することは早くからわかっていた (55)。さらに Brown ら (4) は、60S リボソーム亜粒子の失活によって、EF-1 依存アミノアシル tRNA の結合が阻害されること

表 2. 志賀毒素群毒素の生物活性

毒素	Vero 細胞毒素 CD ₅₀ (pg)	マウス致死活性 LD ₅₀ (ng)
志賀毒素	1.0	28
VT1	1.0	30
VT2	0.75	1.0

図2. 志賀毒素群毒素およびリシンのRNA *N*-グリコシダーゼ活性. ラットの60S リボソーム亜粒子を構成する28S リボソーム RNA の5'末端から4,324番目のアデノシンの *N*-グリコシド結合に作用し、特異的に加水分解をしてアデニンを遊離さす。

を明らかにした。ほぼ同じ頃、われわれは千葉大学薬学部の五十嵐一衛教授との共同研究で、VT1, VT2 の作用機構も志賀毒素と同じ様に、真核細胞の60S リボソーム亜粒子の失活によるEF-1 依存アミノアシル tRNA の結合阻害であることを証明した (23, 48)。VT は、ウサギ網状赤血球を用いた系では蛋白合成を強く阻害するのに対し、小麦麦芽や大腸菌を用いた系では蛋白合成をほとんど阻害しなかった (図2)。このことは、VT が原核細胞由来のリボソームには働かず、真核細胞の、しかもより高等な動物細胞由来の60S リボソーム亜粒子に特異的に作用することを示している。

一方、植物が産生するリボソーム不活化蛋白質も志賀毒素群毒素 (赤痢菌が産生する志賀毒素と腸管出血性大腸菌が産生するVT1 およびVT2) と同様60S リボソーム亜粒子を失活させ蛋白合成を阻害することがわかっていたが、Endo ら (13, 14) は、ヒマ種子由来のリシンの作用機構が、真核細胞の60S リボソーム亜粒子由来の

28S リボソーム RNA の5'末端から4,324番目のアデノシンの *N*-グリコシド結合を加水分解するRNA *N*-グリコシダーゼ活性に基づくと報告した。

リシンの作用機構が志賀毒素群毒素のそれと類似していることから、われわれは遠藤弥重太博士 (当時山梨医科大学助教授、現愛媛大学工学部教授) および五十嵐一衛教授と共同で、遠藤博士らがリシンの作用機構を解明した手法と同様の手法を用いて、志賀毒素群毒素の作用機構を調べた。その結果、志賀毒素群毒素がリシンと全く同じ様に、真核細胞の60S リボソーム亜粒子を構成している28S リボソーム RNA の5'末端から4,324番目のアデノシンの *N*-グリコシド結合を加水分解するRNA *N*-グリコシダーゼ活性であり (図3), その結果EF-1 依存アミノアシル tRNA の60S リボソーム亜粒子への結合を阻害することを明らかにした (15, 18)。Saxena ら (59) は、志賀毒素, VT2vp およびリシンの遺伝子を *Xenopus oocytes* にマイクロインジェクションした

図3. Vero 毒素および志賀毒素の無細胞系ポリフェニルアラニン合成阻害
▲は大腸菌無細胞系, ○は小麦胚無細胞系, ●はウサギ網状赤血球無細胞系. a: VT1, b: VT2

in vivo の系で, この成績を確認した。

5) 無毒変異毒素遺伝子の構築

Hovde ら (22) は, リシンの A 鎖と VT1 の A サブユニットとの相同性を比較するとともに, さらに同様の活性を持つ植物由来のリボソーム不活化蛋白質のアミノ酸配列を比較し, これらの蛋白毒素の一次構造は, 全体としては非常に低い相同性であるにもかかわらず, 局所的に相同性の高い領域が存在することを見出した。その中から VT1 の A サブユニットの N 末端から167番目のグルタミン酸に着目し, 部位特異変異法の手法を適用し, 側鎖の炭素鎖の1つ短いアスパラギン酸への置換体をコードする遺伝子を構築した。作成した変異遺伝子を大腸菌の中で発現させ, 変異毒素の粗毒素液を調整し, ウサギ網状赤血球を用いた無細胞系蛋白合成系で変異毒素の蛋白合成阻害活性を調べた結果, 野生型に比べてアスパラギン酸に置換した変異毒素の活性は, 約1,000分の1に低下していることを証明した。

一方, Montfort ら (40) は, X 線結晶解析によってリシンの3次元構造を示した。この構造に基づき, Ready ら (54) は, リシンなどの植物由来のリボソーム不活化蛋白質間で相同性が高い領域は, リシンの3次元構造に見いだされるクレフト上に存在し, 基質との結合や酵素の活性

表3. 変異 VT1 毒素の活性

変異の部位	Vero 細胞に対する細胞毒性*	蛋白合成阻害活性*
野生型	1	1
Asp 53→Ala	2	10
Arg 55→Ile	1	1
Arg 55→Lys	1/2	1/2
Glu 167→Leu	1/10	1/40
Glu 167→Gln	1/2000	1/400
Ala 168→Gly	1/3	1/2
Leu 169→Ile	1/3	1/3
Arg 170→His	1/100	1/70
Arg 170→Lys	1/200	1/100
Arg 170→Leu	1/1000	1/200
Phe 171→Tyr	1	1/3
Arg 172→Leu	1/100	1/70
Arg 172→Lys	1/5	1/15
Asn 202→Asp	1/8	1/30
Trp 203→Phe	1/10	1/60
Trp 203→Leu	1/50	1/25
Trp 203→His	1/50	1/65
Gly 204→Ala	1	1
Arg 205→Lys	1	1
Arg 205→Thr	1/10	1/10
Leu 206→Val	1	1/6
Ser 207→Ala	1/4	1/3

* 野生型毒素の活性を1とした比活性

表 4. 精製した VT1 と無毒変異 VT1 の生物活性の比較

	Vero 細胞に対する細胞毒性 CD ₅₀ (μg)	マウス致死活性 LD ₅₀ (μg)	蛋白合成阻害活性 ED ₅₀ (μg)
VT1	0.0001	0.04	0.008
E167Q	30	80	>100
R170L	9	10	2
E167Q-R170L	30	60	22

部位として重要である可能性を指摘した。Hovde ら (22) が着目した VT1 の A サブユニットの N 末端から167番目のグルタミン酸は、Ready ら (54) が指摘したクレフト上に存在するアミノ酸であった。

われわれも、VT1, VT2 および 2 種類の VT2 変異株とリシンのアミノ酸配列の相同性の高い領域を探索し、Hovde ら (22) が指摘した 2 領域以外に、VT1 の A サブユニットの N 末端から 51 番目から 55 番目の領域もこれら毒素間で相同性が高いことを示した (76)。この領域を A 領域とし、Hovde ら (22) が指摘した領域をそれぞれ B 領域 (167 番目～171 番目)、C 領域 (202 番目～207 番目) とした。新たに見いだした A 領域も、B, C 領域同様、リシンの 3 次元構造上、Ready ら (54) が活性部位であろうと予想したクレフトに近接していた。これら 3 領域に存在するアミノ酸残基の活性発現に及ぼす影響を調べるため、相同性の高いアミノ酸残基で、活性発現に関与していると考えられるアミノ酸残基 14 種類を選び部位特異変異法の手法を適用し、表 2 に示したような 22 種類の単アミノ酸置換体をコードする遺伝子を構築した (76)。野生型 VT1 遺伝子と 22 種類の変異 VT1 遺伝子を実験室の中で発現させ、粗毒素液を調整し、Vero 細胞毒性和 *in vitro* での蛋白合成阻害活性について調べた結果を表 3 に示した。Hovde ら (22) が指摘した 167 番目のグルタミン酸を類似アミノ酸であるグルタミンに置換した変異毒素 (E167Q) の活性は、野生型毒素に比べて Vero 細胞毒性で 1/2,000 に、*in vitro* での蛋白合成阻害活性で 1/400 に低下した。さらに 170 番目のアルギニンにロイシンに置換した変異毒素 (R170L) も、Vero 細胞毒性で 1/1,000、蛋白合成阻害活性で

1/200 の低下が観察できた。

表 4 は E167Q, R170L に加えて 167 番目のグルタミン酸をグルタミンに置換すると同時に 170 番目のアルギニンをロイシンに置換した変異毒素 (E167Q-R170L) の 3 種類の変異毒素を精製して、それぞれの生物活性 (Vero 毒素活性、マウス致死活性、蛋白合成阻害活性) を調べた成績である (50)。野生株の毒素に比べて生物活性が $1/10^3 \sim 1/10^5$ に低下していることがわかった。これらの結果から、実験系に投与できる蛋白量に限度があることを考慮して、変異毒素のうち E167Q と E167Q-R170L は限りなく無毒であると結論した。

今後は、構築した無毒変異毒素をコードする遺伝子を野生株の毒素遺伝子と置換した菌株が経口生菌ワクチン候補株として利用できるかどうかという課題と、無毒変異毒素そのものをトキソイドワクチンとして利用できないかという課題を追求する予定である。

4. お わ り に

以上概説した平成 9 年度日本細菌学会浅川賞の受賞対象となった研究は、多くの研究者と共同で行ったものである。引用した文献に共同研究者として名を連ねている研究者はもちろんのこと、大阪大学微生物病研究所細菌血清学部、東京大学医科学研究所細菌感染研究部、京都大学医学部微生物学教室および国立国際医療センター研究所において、共に研究に従事したすべての方々に深甚の感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Abe, H., Ichiki, S., Hashimoto, S., Nakano, H., Sato, K., Kanda, T., Yanai, Y., Tsukamoto, T.,

- Kinoshita, Y., Arita, M., Honda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1984): Isolation and characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* from patients with traveller's diarrhoea in Osaka. *J. Diar. Dis. Res.* **2**, 83-87.
- 2) Aimoto, S., Takao, T., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1982): Amino acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **129**, 257-263.
- 3) Alderete, J.F., Robertson, D.C. (1978): Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **19**, 1021-1030.
- 4) Brown, J.E., Obrig, T.G., Ussery, M.A., Moran, T.P. (1986): Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1 inhibits protein synthesis in reticulocyte lysates by inactivation of aminoacyl-tRNA binding. *Microb. Pathog.* **1**, 325-334.
- 5) Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A., Newsome, P.M. (1978): Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.*, **21**, 526-531.
- 6) Calderwood S.B., Acheson, D.W.K., Keusch G.T., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Strockbine, N.A., Swaminathan, B., Kaper, J.B., Levine, M.M., Kaplan, B.S., Karch, H., O'Brien, A.D., Obrig, T.G., Takeda, Y., Tarr, P.I., Wachsmuth, I.K. (1996): Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* **62**, 118-119.
- 7) Calderwood, S.B., Auclair, F., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G.T., Mekalanos, J.J. (1987): Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4363-4368.
- 8) Clements, J.D., Finkelstein, R.A. (1979): Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.* **24**, 760-769.
- 9) Dallas, W.S., Falkow, S. (1980): Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature (London)* **288**, 499-501.
- 10) De, S.N., Bhattacharya, K., Sarkar, J.K. (1956): A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J. Pathol. Bacteriol.* **71**, 201-209.
- 11) De Grandis, S., Ginsberg, J., Toone, M., Climie, S., Friesen, J., Brunton, J. (1987): Nucleotide Sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. *J. Bacteriol.* **169**, 4313-4319.
- 12) Dorner, F. (1975): *Escherichia coli* enterotoxin. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* **250**, 8712-8719.
- 13) Endo, Y., Mitsui, K., Mochizuki, M., Tsurugi, K. (1987): The mechanism of action of ricin and related toxin lectins on eukaryotic ribosomes-The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* **262**, 5908-5912.
- 14) Endo, Y., Tsurugi, K. (1987): RNA *N*-glycosidase activity of ricin A-chain. *J. Biol. Chem.* **262**, 8128-8130.
- 15) Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., Igarashi, K. (1988): Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157: H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA *N*-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* **171**, 45-50.
- 16) Evans, D.J.Jr., Evans, D.G., Gorbach, S.L. (1974): Polymyxin B-induced release of low-molecular weight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **10**, 1010-1017.
- 17) Finkelstein, R.A., LaRue, M.K., Johnston, D.W., Vasil, M.L., Cho, G.J., Jones, J.R. (1976): Isolation and properties of heat-labile enterotoxin(s) from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infet. Dis.* **133**, s120-s137.
- 18) Furutani, M., Ito, K., Oku, Y., Takeda, Y., Igarashi, K. (1990): Demonstration of RNA *N*-glycosidase activity of a Vero toxin (VT2 variant) produced by *Escherichia coli* O91: H21 from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microbiol. Immunol.* **34**, 387-392.
- 19) Geary, S.J., Marchlewicz, B.A., Finkelstein, R.A. (1982): Comparison of heat-labile enterotoxins from porcine and human strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **36**, 215-220.
- 20) Honda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1981): Isolation of special antibodies which react only with homologous enterotoxins from *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **34**, 333-336.
- 21) Honda, T., Tsuji, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1981): Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotox-

- igenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **34**, 337-340.
- 22) Hovde, C.J., Carlenderwood, S.B., Mekalanos, J.J., Collier, R.J. (1988): Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 2568-2572.
 - 23) Igarashi, K., Ogasawara, T., Ito, K., Yutsudo, T., Takeda, Y. (1987): Inhibition of elongation factor 1-dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes by Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157: H7 and by Shiga toxin., FEMS Microbiol. Lett. **44**, 91-94.
 - 24) Ikemura, H., Yoshimura, S., Aimoto, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1984): Synthesis of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain SK-1 of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Bull. Chem. Soc. Jpn. **57**, 2543-2549.
 - 25) Ito, H., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., Nishibuchi, M. (1990): Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91: H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. Microb. Pathog. **8**, 47-60.
 - 26) Jacks, T.M., Wu, B.J., Braemer, A.C., Bidlack, D.E. (1973): Properties of the enterotoxigenic component in *Escherichia coli* enteropathogenic for swine. Infect. Immun. **7**, 178-189.
 - 27) Jackson, M.P., Deresiewicz, R.L., Calderwood, S.B. (1990): Mutational analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin II enzymatic subunits. J. Bacteriol. **172**, 3346-3350.
 - 28) Jackson, M.P., Neill, R.J., O'Brien, A.D., Holmes, R.K., Newland, J.W. (1987): Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. FEMS Microbiol. Lett. **44**, 109-114.
 - 29) Jackson, M.P., Newland, J.W., Holmsee, R.K., O'Brien, A.D. (1987): Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. Microb. Pathog. **2**, 147-153.
 - 30) Johnson, W.M., Lior, H., Beznason, G.S. (1983): Cytotoxic *Escherichia coli* O157: H7 associated with hemorrhagic colitis in Canada. Lancet **i**, **76**.
 - 31) Kohler, E.M. (1971): Observations on enterotoxins produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **176**, 212-219.
 - 32) Konowalchuk, J., Speirs, J.I., Stavric, S. (1977): Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **18**, 775-779.
 - 33) 工藤泰雄 (1979): 輸入感染性腸炎の実態とその検査. 臨床と細菌 **6**, 46-56.
 - 34) Kunkel, S.L., Robertson, D.C. (1979): Factors affecting release of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **23**, 652-659.
 - 35) Larivière, S., Gyles, C.L., Barnum, D.A. (1973): Preliminary characterization of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* F11 (P155). J. Infect. Dis. **128**, 312-320.
 - 36) Lin, Z., Yamasaki, S., Kurazono, H., Ohmura, M., Karasawa, T., Inoue, T., Sakamoto, S., Suganami, T., Takeoka, T., Taniguchi, Y., Takeda, Y. (1993): Cloning and sequencing of two new verotoxin 2 variant genes of *Escherichia coli* isolated from cases of human and bovine diarrhea. Microbiol. Immunol. **37**, 451-459.
 - 37) Marques, L.R.M., Peiris, J.S.M., Gryz, S.J., O'Brien, A.D. (1987): *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Lett. **44**, 33-38.
 - 38) Merson, M.H., Morris, G.K., Sack, D.A., Wells, J.G., Feeley, J.C., Sack, R.B., Creech, W.B., Kapikian, A.Z., Gangarosa, E.J. (1976): Travellers' diarrhea in Mexico. A prospective study of physicians and family members attending a congress. New Eng. J. Med. **294**, 1299-1305.
 - 39) Mitchell, I.G., Tame, M.J., Kenworthy, R. (1974): Separation and purification of enterotoxins from a strain *Escherichia coli* pathogenic for pigs. J. Med. Microbiol. **7**, 439-450.
 - 40) Montfort, W., Villafranca, J.E., Monzingo, A.F., Ernst, S.R., Katzin, B., Rutenber, E., Xuong, N.H., Hamlin, R., Robertus, J.P. (1987): The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. J. Biol. Chem. **262**, 5398-5403.
 - 41) Moon, H.W., Whipp, S.C., Engstrom, G.W., Baetz, A.L. (1970): Response of the rabbit ileal loop to cell-free products from *Escherichia coli* enteropathogenic for swine. J. Infect. Dis. **121**, 182-187.
 - 42) Nishibuchi, M., Yamasaki, S., Ito, H., Terai, A., Kurazono, H., Furutani, M., Ito, K., Igarashi, K., Takeda, Y. (1989): Comparative analysis of structure-function relationship of Vero toxins produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. The 25th Joint Conference U.S.-Japan Cooperative Medical

- Science Program Cholera Panel. Abstract 55-56.
- 43) Noda, M., Yutsudo, T., Nakabayashi, N., Hirayama, T., Takeda Y. (1987): Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157: H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. *Microb. Pathog.* **2**, 339-349.
 - 44) O'Brien, A.D., Laveck, G.D. (1983): Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **40**, 675-683.
 - 45) O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thomposon, M.R., Formal, S.B. (1982): Production of *Shigella dysenteriae* type 1 cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **146**, 763-769.
 - 46) O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chang, T.W., Gorbach, S.L. (1983): Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157: H7 strain associated with haemorrhagic colitis. *Lancet* ii, **573**.
 - 47) O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W., Formal, S.B. (1983): *Escherichia coli* O157: H7 strains associated with hemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* i, **702**.
 - 48) Ogasawara, T., Ito, K., Igarashi, K., Yutsudo, T., Nakabayashi, N., Takeda, Y. (1988): Inhibition of protein synthesis by a Vero toxin (VT2 or Shiga-like toxin II) produced by *Escherichia coli* O157: H7 at the level of elongation factor 1-dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes., *Microb. Pathog.* **4**, 127-135.
 - 49) 大村真理, 胡 淳太, 山崎伸二, 竹田美文 (1996): 新しい VT1 variant 遺伝子の構造決定. *日本細菌学雑誌* **51**, 310.
 - 50) Ohmura, M., Yamasaki, S., Kurazono, H., Kashiwagi, K., Igarashi, K., Takeda, Y. (1993): Characterization of non-toxic mutant toxins of Vero toxin 1 that were constructed by replacing amino acids in the A subunit. *Microb. Pathog.* **15**, 169-176.
 - 51) Oku, Y., Yutsudo, T., Hirayama, T., O'Brien, A.D., Takeda, Y. (1989): Purification and some properties of a Vero toxin from a human strain of *Escherichia coli* that is immunologically related to Shiga-like toxin II (VT2). *Microb. Pathog.* **6**, 113-122.
 - 52) Paton A.W., Beutin, L., Paton, J.C. (1995): Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. *Gene* **153**, 71-74.
 - 53) Paton A.W., Paton, J.C., Goldwater, P., Heuzenroeder, M.W., Manning, P. (1993): Sequence of a variant Shiga-like toxin type-I operon of *Escherichia coli* O111: H-. *Gene* **129**, 87-92.
 - 54) Ready, M.P., Katzin, B.J., Robertus, J.D. (1988): Ribosome-inhibiting proteins, retroviral reverse transcriptases, and RNase H share common structural elements. *Proteins* **3**, 53-59.
 - 55) Reisbig, R.S., Olsnes, S., Eiklid, K. (1981): The cytotoxic activity of *Shigella* toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* **256**, 8739-8744.
 - 56) Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Choen, M.L. (1983): Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**, 681-685.
 - 57) Sack, R.B., Gorbach, S.L., Banwell, J.G., Jacobs, B., Chatterjee, B.D., Mitra, R.C. (1971): Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis.* **123**, 378-385.
 - 58) 佐久一枝, 彦根恵子, 柏真智子 (1986): 下痢患者よりの *Escherichia coli* O157: H7 および O157: H- の分離. *感染症学雑誌*, **60**, 640.
 - 59) Saxena, S.K., O'Brien, A.D., Ackerman, E.J. (1989): Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA *N*-glycosidases of 28S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **264**, 596-601.
 - 60) Schenkein, I., Green, R.F., Santos, D.S., Maas, W.K. (1976): Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **13**, 1710-1720.
 - 61) Scotland, S.M., Day, N.P., Rowe, B. (1980): Production of a cytotoxin affecting Vero cells by strains of *Escherichia coli* belonging to traditional enteropathogenic serogroups. *FEMS Microbiol. Lett.* **7**, 15-17.
 - 62) Scotland, S.M., Smith, H.R., Rowe, B. (1985): Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. *Lancet* ii, 885-886.
 - 63) Seidah, N.G., Donohue-Rolfe, A., Lazure, C., Auclair, F., Keusch, G.T., Chretien, M. (1986): Complete amino acid sequence of Shigella toxin B-chain. A novel polypeptide containing 69 amino acids and one disulfide bridge. *J. Biol. Chem.* **261**,

- 13928-13931.
- 64) Smith, H.W., Gyles, C.L. (1970): The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol., **3**, 387-401.
 - 65) So, M., McCarthy, B.J. (1980): Nucleotide sequence of transposon Tn 1681 encoding a heat-stable toxin (ST) and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **77**, 4011-4015.
 - 66) Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K., O'Brien, A.D. (1988): Cloning and sequencing of the gene for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. J. Bacteriol. **170**, 1116-1122.
 - 67) Strockbine, N.A., Marques, L.R.M., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K., O'Brien, A.D. (1986): Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157: H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infect. Immun. **53**, 135-140.
 - 68) Takao, T., Hitouji, T., Aimoto, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1983): Amino acid sequence of a heat-stable enterotoxin isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 18D. FEBS Lett. **152**, 1-5.
 - 69) Takao, T., Tanabe, T., Hong, Y.-M., Shimonishi, T., Kurazono, H., Yutsudo, T., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Takeda, Y. (1988): Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157: H7 with that of Shiga toxin. Microb. Pathog. **5**, 357-369.
 - 70) Takeda, Y., Honda, T., Sima, H., Tsuji, T., Miwatani, T. (1983): Analysis of antigenic determinants in cholera enterotoxin and heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **41**, 50-53.
 - 71) Takeda, Y., Kurazono, H., Yamasaki, S. (1993): Vero toxins (Shiga-like toxins) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Verocytotoxin-producing *E. coli*). Microbiol. Immunol. **37**, 591-599.
 - 72) 竹田美文, 下西康嗣, 山本達男, 竹田多恵 (1986): 毒素原性大腸菌のエンテロトキシン. 蛋白質核酸酵素 **31**, 324-352.
 - 73) Takeda, Y., Taga, S., Miwatani, T. (1979): Purification of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Letters. **5**, 181-186.
 - 74) Tsuji, T., Taga, S., Honda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1982): Molecular heterogeneity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **38**, 444-448.
 - 75) Wade, W.G., Thom, B.T., Evans, N. (1979): Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. Lancet ii, 1235
 - 76) Yamasaki, S., Furutani, M., Ito, K., Igarashi, K., Nishibuchi, M., Takeda, Y. (1991): Importance of arginine at position 170 of the A subunit of Vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity. Microb. Pathog. **11**, 1-9.
 - 77) 山崎伸二, 竹田美文 (1996): Vero 毒素の構造と生物活性. 臨床と微生物 **23**, 785-799.
 - 78) Yoshimura, S., Ikemura, H., Watanabe, H., Aimoto, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Miwatani, T., Takeda, Y. (1985): Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEBS Lett., **181**, 138-142.
 - 79) Yoshimura, S., Miki, M., Ikemura, H., Aimoto, S., Shimonishi, Y., Takeda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1984): Chemical synthesis of a heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 18D. Bull. Chem. Soc. Jpn. **57**, 125-133.
 - 80) Yutsudo, T., Nakabayashi, N., Hirayama, T., Takeda, Y. (1987): Purification and some properties of Vero toxin from *Escherichia coli* O157: H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. Microb. Pathog. **3**, 21-30.
 - 81) 湯通堂隆, 中林尚美, 佐久一枝, 野田公俊, 平山壽哉, 竹田美文 (1996): *Escherichia coli* O157: H7 が産生する Shiga toxin と抗原性の異なる Vero toxin の精製と性状. 日本細菌学雑誌, **41**, 328.