

博士論文番号：0481014

ジフテリア毒素受容体を用いた  
標的細胞ノックアウト法の改良

～毒素免疫寛容マウス及び骨粗鬆症モデルマウスの作製～

木村 泰子

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座  
(河野 憲二 教授)

平成19年5月21日提出

## 目次

### 第 1 章 : 毒素免疫寛容マウスの作製

1-1. 序論	6
1-2. 材料と方法	12
1-2-1 BALB/cA 及び C57BL/6J マウスの DT 連続投与	12
1-2-2 ELISA による抗体産生解析	12
1-2-3 血中 DT 活性の検出	12
1-2-4 プラスミド作製	13
1-2-5 酵母菌株及び発現プラスミド	14
1-2-6 酵母へのプラスミドの導入	14
1-2-7 細胞培養	16
1-2-8 トランスフェクション	16
1-2-9 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入	16
パッケージング細胞 PLAT-E へのトランスフェクション	16
標的細胞への感染 (遺伝子導入)	17
1-2-10 FACS 解析	17
1-2-11 培養細胞及びマウス組織からのタンパク質回収	17
1-2-12 Western 解析	17
1-2-13 酵母からのタンパク質回収	18
1-2-14 リコンビナント DTA の作製	18
目的タンパク質の発現確認	18
GST 融合 DTA の精製	19
1-2-15 ADP リボシル化活性測定	19
1-2-16 Tg マウスの作製	20
トランスジーンの作製	20
受精卵の採取	20
マイクロインジェクションと移植	20
1-2-17 マウス尾からのゲノム回収	21
1-2-18 Genomic PCR	21
1-2-19 Southern 解析	21
プローブの調整	21
ハイブリダイゼーション	22
1-2-20 血球からの RNA 回収	22
1-2-21 RT-PCR	22
1-2-22 Northern 解析	23

1-2-23	組織凍結切片作製	23
1-2-24	HE 染色	23
1-2-25	マウスの DT 免疫	23
1-3	結果	25
1-3-1	5 $\mu$ g/kg の DT 投与で抗体を産生する	25
1-3-2	マウス体内で産生した抗体は DT の中和抗体として作用する	25
1-3-3	変異型毒素の細胞毒性解析	28
	K51E/E148K は完全に毒素活性を消失した変異体である	28
	酵母細胞において	28
	動物培養細胞において	28
	EF-2 変異株では CRM197 による細胞毒性は認められない	29
	MKK-M(H699M) でのみ WT の DT 発現を確認することができる	30
	CRM197 及び K51E/E148K はともに EF-2 を ADP リボシル化する	30
1-3-4	K51E/E148K 変異型毒素 Tg マウスの作製	43
1-3-5	変異型 DT-Tg マウスは DT に対して免疫寛容を獲得している	44
1-4	考察	50

## 第 2 章 : 骨粗鬆症モデルマウスの作製

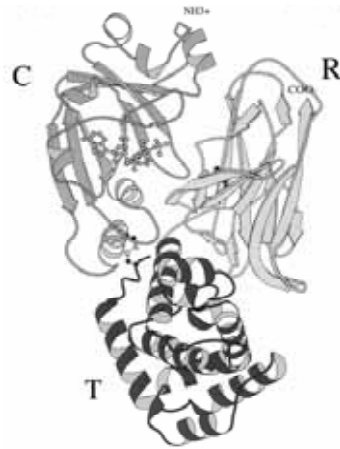
2-1	序論	55
2-2	材料と方法	57
2-2-1	細胞	57
2-2-2	MC3T3-E1 の DT 感受性試験	57
2-2-3	Tg マウス作製	57
	トランスジーン の作製	57
	受精卵の採取	58
	マイクロインジェクションと移植	58
2-2-4	マウス尾からのゲノム回収	58
2-2-5	Southern 解析	58
	プローブの調整	59
	ハイブリダイゼーション	59
2-2-6	genomic PCR	59
2-2-7	血中 DT 活性の検出	59
2-2-8	培養細胞からのタンパク質回収	60
2-2-9	RT-PCR	60
	マウス組織からの RNA 回収	60

PCR 反応.....	60
2-2-10 骨組織パラフィン切片の作製.....	61
組織の固定.....	61
脱灰.....	61
脱水・脱脂.....	61
パラフィン浸透・包埋.....	61
薄切.....	61
脱パラフィン処理.....	62
2-2-11 骨組織凍結切片作製.....	62
2-2-12 HE 染色.....	62
2-2-13 免疫染色.....	62
2-3 結果.....	64
2-3-1 マウス骨芽細胞培養株 MC3T3-E1 で hHB-EGF は DT 受容体として機能する.....	64
2-3-2 Tg マウスの作製及び発現確認.....	64
RT-PCR.....	64
免疫染色.....	65
2-3-3 50 $\mu$ g/kg の DT 連続投与.....	65
2-3-4 10 $\mu$ g/kg DT の 1 週間及び 2 週間連続投与.....	66
2-3-5 10 $\mu$ g/kg DT の 1 ヶ月連続投与.....	66
2-4 考察.....	75
2-5 謝辞.....	78
引用文献.....	79

**第 1 章**  
**毒素免疫寛容マウスの作製**

## 1-1.序論

ある組織や細胞の生体内での役割を明らかにするアプローチとして、それらの細胞群を除去してその機能を解析する方法がある。これまで物理的手法としては組織の外科的除去やレーザーを用いた細胞破壊などが、また発生工学的な手法としては毒素遺伝子を組織特異的なプロモーターの下流に連結し、その細胞のみを破壊する方法が利用されてきた (Palmiter AM Jr. *et al.*, 1987, Breitman ML. *et al.*, 1987, Borrelli E. *et al.*, 1988, Heyman RA. *et al.*, 1989, Lowell BB. *et al.*, 1993, Ross SR. *et al.*, 1993, Palmiter AM Jr. *et al.*, 2001)。しかし、これらの方法にはそれぞれ問題点がある。実際に外科的手法で散在する細胞を全て除去することは不可能であるし、毒素遺伝子が胎児期に発現し胎児が死亡した場合にはその後の機能解析は困難であるため、標的細胞を任意の時期に容易に除去することはできない。そこで我々の研究室ではこれまでに、マウスを用いたジフテリア毒素受容体を介した細胞ノックアウト法 (Toxin Receptor-mediated Cell Knockout: TRECK) を開発し、実際に肝炎モデルマウスの作製に成功した (Saito M. *et al.*, 2001)。



**DTの構造**

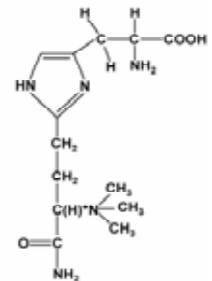
Collier RJ. *et al.*, 2001

TRECK法で使用するジフテリア毒素 (DT) は、DTの遺伝子をコードしているファージに感染し溶原化している病原性ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) が分泌する菌体外毒素で535アミノ酸から成る一本鎖のポリペプチド (分子量約58,000) として産生され、A, B 2つのフラグメントを持つ。DTはBフラグメントのRドメインで標的細胞表面に存在するDT受容体であるヒトのヘパリン結合性EGF様増殖因子 (hHB-EGF) と結合しエンドサイトーシスによりTドメインを介して細胞内に進入することが知られている。エンドソーム内は酸性条件下であるため、DTの立体構造変化が起こり活性中心であるAフラグメント (Cドメイン) のみがサイトゾルに放出され毒素活性を示す (Draper RK. *et al.*, 1980, Sandvig K. *et al.*, 1980) 参考1)。

一方、DTのターゲットであるEF-2 (elongation factor 2)

は真核生物で高度に保存されているペプチド鎖伸長因子

である (Fig.1)。EF-2はG-protein スーパーファミリーのひとつで、脱アシル化tRNAを輸送するポストペプチジルトランスフェラーゼの活性を触媒し、ペプチジ



**ジフタマイド**

Ivankovic M. *et al.*, 2006

ルtRNAをリボソームのEサイトからPサイトへと移す。EF-2は、715番目のヒスチジン(His)が(酵母では699番目に相当)、特徴的な翻訳後修飾を受けジフタマイドを形成する(Van Ness BG. *et al.*, 1978, Kohno K. *et al.*, 1986)。DTはNAD<sup>+</sup>のADPリボースをジフタマイドのイミダゾール環の1位のNに転移し(ADPリボシル化)、EF-2を不活性化させることで細胞のタンパク質合成を阻害する(Honjo T. *et al.*, 1968, Pappenheimer RD. 1977, Kohno K. *et al.*, 1986, Mekada E. *et al.*, 1988, Moskaug JO. *et al.*, 1991)。

ヒトのHB-EGFはDT受容体として機能するが、マウスのHB-EGFは、その相同性の違いからDT受容体としては機能しない(Mitamura T. *et al.*, 1995)。この差異を利用してTRECK法では、まず組織特異的プロモーターの下流にDT受容体であるhHB-EGFを連結し、トランスジェニック(Tg)マウスを作製する。得られるTgマウスは組織特異的にDT受容体を発現しているため、DTを投与した場合にのみ特定の組織を破壊することが可能になる(参考2)。これまでに我々の研究室で得られた肝炎モデルマウスでは、DT投与依存的に発症の時期や症状の程度をコントロールすることが可能であった(Saito M. *et al.*, 2001)。このように、TRECK法は任意の時期に特定の細胞のみを除去することが可能なため、まだ機能が明らかにされていない細胞の解析や、発生過程におけるその細胞系譜の役割について明らかにすることが可能である。

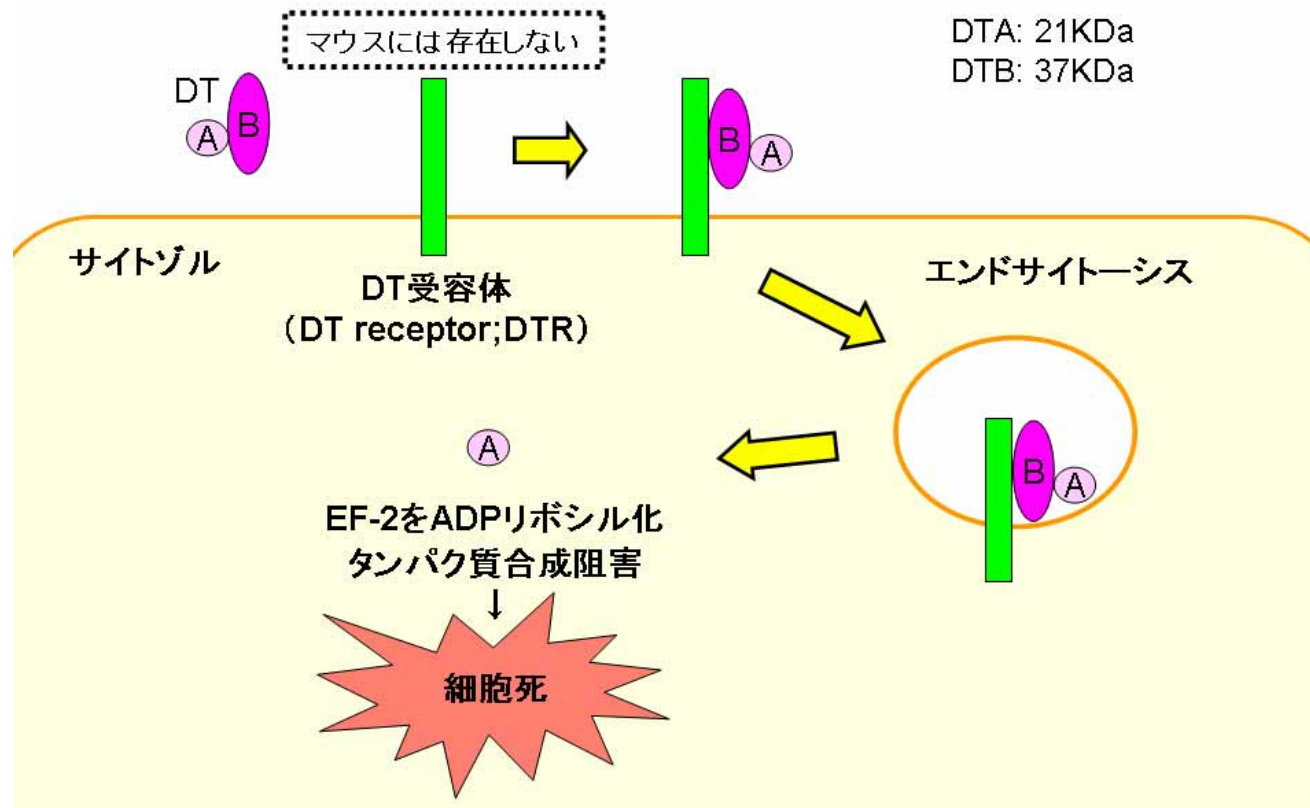
しかし、TRECK法にはまだいくつかの課題が残されている。DTの受容体であるhHB-EGFは増殖因子であり、膜結合型として合成されプロテアーゼによる切断を受けて分泌型になる。肝炎モデルマウスの場合には特に影響は見られなかったが、hHB-EGFが心肥大に関与するという報告があり(Asakura M. *et al.*, 2002)、増殖因子活性が問題になる可能性が考えられる。またhHB-EGFは膜結合型の場合にのみ受容体として機能するため、プロテアーゼにより切断されてしまうとDTの受容体としては機能しない。そこでこれらの問題を改善するために、増殖因子活性を失いプロテアーゼによる切断を受けない受容体の改良を行っている(当研究室古川智久修士論文、Furukawa N. *et al.*, 2006)。さらに、標的にする細胞や疾患の種類によってはDTの長期的な投与が必要になってくる場合が考えられる。例えば、再生可能な組織やDTの届きにくい骨や脳を標的とした場合には高濃度のDTを複数回投与する場合が想定される(Buch T. *et al.*, 2005)。しかし、DTはマウスにとって異種タンパクであるためDTの連続投与を行うとマウス体内に抗体が産生し、投与したDTが中和されてしまい長期的な組織破壊ができなくなる恐れがあるため(木村泰子修士論文)、DTに対する抗体を産生しないマウスを用いる必要がある。一般的に、異種タンパクを発現しているTgマウスは、そのタンパクに対して免疫寛容を獲得していることが知られ

ている (Miller JF. *et al.*, 1989, Adams TE. 1990, Lai JC. *et al.*, 1998)。そこで、活性消失型DTを発現するTgマウスの作製を試みた。DTは細胞内に1分子でも存在すると、細胞を死に至らしめるため (Yamaizumi M. *et al.*, 1978)、完全に毒性を消失した変異型DTをトランスジーンとして採用する必要がある。このマウスは、発生初期より変異型DTを発現するためDTを自己タンパクとして認識しDTに対する免疫寛容を獲得することが期待される。用いた変異体はCRM: Cross reacting material 197と呼ばれるG52E変異体とK51E/E148K変異体である。CRM197はDT遺伝子を持つジフテリアバクテリオファージにランダム変異を導入して得られた変異体の1つでDT活性は検出されないがDT抗体と反応することが知られている (Collier RJ. 1982, Uchida T. *et al.*, 1973)。K51E/E148Kは酵母を用いた活性消失型DTのスクリーニングにより報告されている変異体である (Fu H. *et al.*, 1997)。これらの変異体をトランスジーンの候補として検討し、DT免疫寛容マウスの作製を試みたので報告する。





## ジフテリア毒素 (Diphtheria toxin; DT) の作用機序

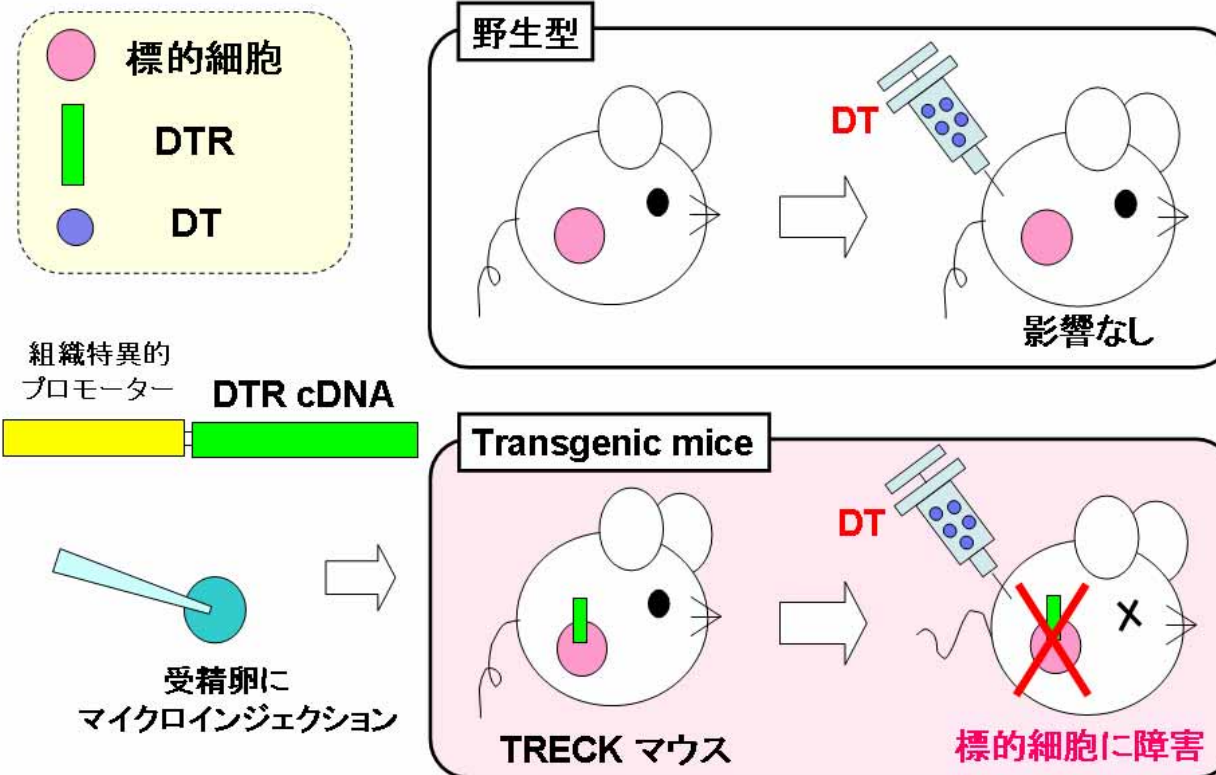


参考 1) DT の作用機序

DT は標的細胞膜上の DT 受容体 (DTR) に B フラグメントを介して結合し細胞内に取り込まれる。毒素活性を持つ A フラグメントがサイトゾル内に放出されペプチド鎖伸長因子である EF-2 を ADP リボシル化し不活性化することで細胞を死に至らしめる。

# TRECK法

(Toxin Receptor-mediated Cell Knockout)



## 参考 2) TRECK 法の概要

野生型のマウスは DTR を持たないので DT 投与による影響は見られない。一方、組織特異的に DTR を発現する TRECK マウスは DT の投与量や時期依存的に特定の細胞にのみ障害を与えることが可能になる。

## 1-2.材料と方法

本研究においてプラスミド作製には大腸菌のDH5 $\alpha$ を用いた。また各制限酵素はTaKaRa社のものを使用した。オリゴDNA合成は北海道システムサイエンス社による。マウスは全て日本クレア株式会社(CLEA Japan, Inc.)から購入し、DTはジフテリア菌(PW8株)の培養上清より精製したのものを用いた(Ishii-Kanei C. *et al.*, 1979、当研究室岩脇隆夫修士論文)。

### 1-2-1 BALB/cA Jcl 及び C57BL/6J Jcl マウスの DT 連続投与

BALB/cA Jcl 及び C57BL/6J Jcl の 5 週齢雌マウスに体重 kg あたり 0.5 $\mu$ g/kg、5 $\mu$ g/kg、50 $\mu$ g/kg になるように DT を滅菌した PBS(-) で希釈し、それぞれ 5 匹ずつ腹腔内投与を行った。当研究室でのこれまでの解析により 50 $\mu$ g/kg の DT を投与した場合、血中の DT は約 3 日で代謝されると考えられる(当研究室岩脇隆夫修士論文)。そのため、投与は 3 日毎に行いコントロールとしては PBS(-) を使用した。マウス尾静脈からの採血は 5 日毎に行い投与開始から 30 日後(計 10 回投与)、回収した血清で ELISA を行った。また、連続投与後に新たに 50 $\mu$ g/kg の DT を単回投与し、6 時間後の血中残存毒素を  $^{35}$ S の取り込みにより測定した。

### 1-2-2 ELISA による抗体産生解析

マウスから採血した血液を遠心(1,000rpm、4 $^{\circ}$ C、10分)し血清を回収した。まず、平底 96well assay Plate(#353912:FALCON)に抗原として PBS(-) で希釈した 4 $\mu$ g/ml の DT を 50 $\mu$ l/well 加え、室温 1~2 時間、もしくは 4 $^{\circ}$ C で一晩静置して抗原を coat した。PBS(-) で 3 回洗浄後 100 $\mu$ l の 1% BSA/PBS(-) を用いて室温で 1 時間 blocking した。次に、1 次抗体としてマウス血清を 1% BSA/PBS(-) で、Balb/cA の場合は 1,000 倍希釈、C57BL/6J の場合には 100 倍希釈し 50 $\mu$ l/well ずつ添加し室温で 1 時間静置した。さらに、PBS(-) で 3 回洗浄後、2 次抗体として HRP-conjugated goat anti-mouse IgG(DAKO) を 1% BSA/PBS(-) で 2,000 倍希釈し、100 $\mu$ l ずつ添加し室温で 1 時間静置後 PBS(-) を用いて洗浄した。その後、発色液(10mg O-Phenylene diamine、1ml 1M citrate buffer (pH4.5)、4 $\mu$ l H $_2$ O $_2$ /10ml ddH $_2$ O) を 100 $\mu$ l ずつ添加し室温で 30 分間発色させ、吸光度(450nm) A $_{450}$  を測定した。

### 1-2-3 血中 DT 活性の検出

24 well plastic dish(#3526:CORNING) に  $5.0 \times 10^4$  cells/well になるよう DT

感受性であるVero細胞を培養し、その培養液中(500 $\mu$ l)に希釈した血清をそれぞれ5 $\mu$ lずつ加え6時間培養した。その後200 $\mu$ lのメチオニン、システイン不含培地(Gibco BRL)に交換し<sup>35</sup>Sラベル化メチオニン、システイン溶液(5 $\mu$ Ci/ml、#NEG-772:NEN)を加え1時間培養した。さらにPBS(-)で2回洗浄し、細胞を0.1N NaOHで溶解し10%トリクロロ酢酸を加えた。生成した沈殿物を10穴吸引式 glass filter フォルダールを用いて25mm glass filter (#1822-025:Whatman)に吸着させ、その放射活性を液体シンチレーションカウンター(BECKMAN)で測定した。

#### 1-2-4 プラスミド作製

pDT201 (Leong D. *et al.*, 1983)をDTA-WTとしてテンプレートに使用し、PCRを用いてCRM197変異プラスミドを作製した。DTA-CRM197フラグメントはpCAGGS (Niwa H. *et al.*, 1991) にEco R で導入した。使用したオリゴヌクレオチドプライマーは以下の通りである。(下線はRco R を、点線はミスマッチ変異導入部分を示す。)

DTA(+):	CCC CTC GAG <u>GAA TTC</u> ACC ATG	98	,5分	} 35サイクル
	GGC GCT GAT GAT GTT GTT GAT	98	,30秒	
	TCT TCT AAA TAT TTT GTG ATG G	58	,30秒	
G52E-R:	TCG GTA CTA TAA AAC <u>TCT</u> TTC CAA	72	,30秒	
	TC	72	,7分	
		4	,	

pDT201、pBS-K51E/E148K-DTA (Fu H. *et al.*, 1997)それぞれをテンプレートに以下に示すプライマーを用いて DTA 部分を増幅し、Eco R で切り出し pCAGGS に挿入した (Fig.4)。完全長変異型 DT は pBS-DTA -K51E/E148K に p $\beta$ 176 (Gen Bank Accession No.M19546) から Hin d と Bal で切り出した B フラグメントを導入し、そこから完全長 DT を Eco R で切り出し pCAGGS に導入することで作製した。PCR には Pyrobest® DNA polymerase (TaKaRa) を使用した。

5-X-E-DTA :	CCG <u>CTC GAG</u> <u>GAA TTC</u> ACC ATG	98	,5分	} 35サイクル
	GGC GCT GAT GTT GTT GAT	98	,30秒	
	TCT TCT AAA TCT TTT GTG	58	,30秒	
	ATG G	72	,30秒	
		72	,7分	
		4	,	

DTA (-): CCC AAG CTT CGA ATT CGG ATC CTC ATC GCC TG

下線は*Eco* R、二重下線は*Xho*、波線は*Hin* d サイトを示す。

#### 1-2-5 酵母菌株及び発現プラスミド

本研究で用いた酵母菌株については表 1 に示した。  
酵母発現用プラスミドは、GAL1 プロモーターを持つ CEN 型、*URA3* マーカーの pMGU10 ベクター (Iha H. *et al.*, 1998) を使用し、それぞれ上記の pCAGGS ベースのプラスミド (Fig.4) より *Eco* R で切り出した DTA フラグメントを導入した (pMGU10-DTA-WT、CRM197、K51E/E148K) (Fig.5)。酵母菌株は合成最小グルコース培地 (SD) およびグルコースの代わりに 2% のガラクトースを含む合成最小ガラクトース培地 (SG) で培養した。必要に応じて 2% アガーを添加した。酵母の遺伝学的操作については Kaiser C. *et al.*, 1994 を参考に行った。

#### 1-2-6 酵母へのプラスミドの導入

酵母へのプラスミド導入には酢酸リチウム法を用いた。まず YPD 培地 1ml、30 で一晩培養した酵母培養液を 30ml の YPD に植菌し、さらに 4 時間培養した。これを 3,000rpm、5 分遠心して集菌し、まず 10ml の TE buffer (10mM Tris-Cl (pH8.0)、1mM EDTA)、次に約 5ml の TE-LiAc buffer (10mM Tris-Cl (pH8.0)、1mM EDTA、100mM 酢酸リチウム) でそれぞれ 1 回ずつ洗浄した。それを TE-LiAc buffer 400 $\mu$ l に懸濁し、30 で 1 時間緩やかに攪拌した。この菌体懸濁液から 100 $\mu$ l を分取し、10mg/ml 牛胸腺 DNA (キャリア DNA) 5 $\mu$ l、プラスミド溶液約 1 $\mu$ g 分を加え、30 で 30 分間静置した。これに 40% PEG4000 を含む TE-LiAc buffer 700 $\mu$ l を加え、再度 30 で 45 分間静置後寒天培地にまき 30 で培養した。スポットは OD<sub>600</sub>=0.2 を原液として ddH<sub>2</sub>O で 10 倍ずつ段階希釈し 2 $\mu$ l ずつ寒天培地にスポットした。

Strain	Relevant genotype	Source
FY24	MAT@ ura3 trp1 leu2 GAL2	Winston F. et al. 1995
SE2-GR	MATa ura3-52 leu2-3 his3-Δ 200 trp1-Δ 901 eft1::LEU2 eft2::HIS3 [pRS314(TRP)-EFT2(G701R)]	Kimata Y. et al. 1993
MKK-M	MAT a ura3-52 leu2-3,112 his3-Δ 200 trp1-Δ 901 eft1::LEU2 eft2::HIS3 [pRS314(TRP)-EFT2(H699M)]	Kimata Y. et al. 1994
LMY10	MAT @ ura3-52 dph5	Mattheakis LC. et al. 1992
LMY11	MAT @ ura3-52 dph2	Mattheakis LC. et al. 1992

表 1. 本研究で使用した酵母菌株

FY24 は EF-2 野生株、SE2-GR 及び MKK-M は EF-2 変異株、LMY10 及び LMY11 株は EF-2 修飾酵素機能欠損株として使用した。酵母には EFT1、EFT2 の 2 つが存在し同じタンパク質をコードするため、両方欠損してはじめて表現形が認められる。

### 1-2-7 細胞培養

全ての細胞は 37℃、5% CO<sub>2</sub> で培養した。NIH3T3 細胞及び Ltk- 細胞 (Kohno K. *et al.*, 1987)、COS7 細胞、HeLa 細胞、CHOK-1 細胞、KEE1 細胞 (Kohno K. *et al.*, 1985, Kohno K. *et al.*, 1987)、Vero 細胞 (大阪大学微生物病研究所、目加田英輔博士より供与) については 10% FCS を含む MEM 培地 (#M4526:SIGMA) で培養し、PLAT-E 細胞 (Morita S. *et al.*, 2000) は 10% FCS、1µg/ml ピューロマイシン (# 161-19391:Wako)、10µg/ml プラトシチジン (# R21001:Invitrogen)、1% ペニシリン (# 023-07731:Wako) と 1% ストレプトマイシン (# 196-08511:Wako) を添加した DMEM 培地 (#D6546:SIGMA) で培養した。トリプシン処理には 0.01% トリプシン/0.05% EDTA を用いた。

### 1-2-8 トランスフェクション

Ltk- 細胞、COS7 細胞、CHOK-1 細胞、KEE1 細胞 へのトランスフェクションはリポフェクションにより行った。24 well dish (# 3513:CORNING) で培養した細胞に Effecten (QIAGEN) を用いてルシフェラーゼレポーター (pCAG-GL3、当研究室岩脇隆夫博士作製): エフェクター (pCAG-DTA-WT、CRM197、K51E/E148K) が 1:4 になる様にマニュアルに従いトランスフェクションを行った。24 時間後、細胞からタンパク質を回収しサンプルとして使用した。毒素のタンパク質合成阻害活性はルシフェラーゼ活性を指標とすることで定量し、活性測定には Luciferase TM Reporter Assay System (Promega) を用いた。

### 1-2-9 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

パッケージング細胞 PLAT-E、レトロウイルス発現ベクター pMXc-IRES-GFP プラスミド (以下 pMXc ベクター) は東京大学医科学研究所の北村俊雄博士に供与して頂いた。導入プラスミドとして、pCAG-DTA より DTA 部分を *Eco* R により切り出し pMXc ベクターに挿入し pMXc-IG-DTA (WT、CRM197、K51E/E148K) を作製した (Fig.7)。

### パッケージング細胞 PLAT-E へのトランスフェクション

PLAT-E 細胞 を 6cm plastic dish (# 25060-61:CORNING) に 10µg/ml ペニシリン、10µg/ml ストレプトマイシンを含む培地 4ml で  $2.0 \times 10^6$  cells になるよう前培養した。トランスフェクションは FuGENE6 (ROCHE) を用いたリポフェクション法により行った。血清を含まない培地 100µl に 6µl の FuGENE6 を加え、軽く懸濁し 5 分間室温で静置した後、3µg のプラスミドを加え軽く懸濁した。



15分間室温で静置しPLAT-E細胞に滴下した。24時間培養後培地を交換し、さらに24時間培養してその上清をウイルス溶液とした。

### 標的細胞への感染(遺伝子導入)

感染18時間前に10cm dish (#430167: CORNING) に $2 \times 10^5$  cellsで前培養したNIH3T3細胞にウイルス溶液4mlを加え、さらに $8 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるようポリブレン(#H-9268: SIGMA)を加えることでインフェクションによる遺伝子導入を行った。ポリブレンはポリカチオンであり、細胞膜とウイルス外皮の陰電荷を相殺することによって膜への吸着を促進する。また、PLAT-E細胞で産生されるレトロウイルスは齧歯類由来の細胞のみを標的細胞とするためヒトへの感染は起こらない。用いたウイルス溶液や細胞はオートクレーブ処理を行ってから廃棄した。

### 1-2-10 FACS解析

Dish からトリプシン処理により回収した細胞を0.05%BSA / PBS(-)に懸濁し、20,000個の細胞をFACSCalibur (BD)を用いて測定した。

### 1-2-11 培養細胞及びマウス組織からのタンパク質回収

トリプシン処理で細胞を回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1% NP-40、1mM EDTA、 $2 \mu\text{g/ml}$ アプロチニン(#03346-84: nacalai tesque)、 $2 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン(#L-2884: SIGMA)、 $1 \mu\text{g/ml}$ ペプスタチン(#4397: ペプチド研究所)、 $100 \mu\text{g/ml}$  PMSF(#273-27: nacalai tesque)を含むPBS(-)に懸濁し氷上で20分間静置した。その後、遠心(15,000rpm、4、2分)し上清を回収した。マウス組織からタンパク質を回収する場合は上記buffer内でホモジナイズ後遠心し、上清をサンプルとして回収した。

### 1-2-12 Western 解析

細胞及び組織から回収したタンパク質はBCA法により濃度を測定した(PIERCE)。サンプルは50mM Tris-HCl(pH 6.8)、1% SDS、0.01% BPB、10% Glycerol、0.1M DTTとなるように調整した。5分間100 で処理し10%アクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロースメンブラン(#10401196: Schleicher & Schuell)にblottingし、10%スキムミルク(#31149-75: nacalai tesque)/PBS(-)で blocking を行った。1次抗体として当研究室所有の抗毒素ウマ抗体を100倍希釈し室温で1時間処理後、10% Tween20/PBSで3回洗浄した。2次抗体としてHRP-conjugated rabbit anti-horse IgG (L+H):(ICN)

を1,000倍希釈し室温で1時間処理した。コントロールとして用いたGAPDHの場合は、1次抗体としてanti-mouse GAPDH (# ab9484: abcam)を1,000倍希釈して使用し2次抗体にはHRP-conjugated anti-mouse IgG (# 55570: CAPPEL)を1,000倍希釈して使用した。その後、ECL Western blotting detection system (Amersham Bioscience)で発色させルミノイメージアナライザー (FUJIFILM)を用いて検出した。

### 1-2-13 酵母からのタンパク質回収

5ml の培養液から菌体を回収し、200 $\mu$ l の Lysis buffer (10mM Tris-Cl (pH7.5)、1mM EDTA、1mM EGTA、5mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、2mM PMSF (# 273-27: nacalai tesque)、0.2mg/ml アプロチニン (# 03346-84: nacalai tesque)、0.2mg/ml ペプスタチン (# 4397: ペプチド研究所)、0.2mg/ml ロイペプチン (# L-2884: SIGMA))に懸濁し、ガラスビーズを用いて菌体を破碎した。15,000rpm、4、15分で遠心後、回収した Lysate 50 $\mu$ g を Western 解析に使用した。ADP リボシル化アッセイに用いる場合には、100ml までスケールアップし同様に回収した。最後に Lysate を透析 buffer (10mM Tris-Cl、50mM KCl、2.5mM EDTA、1.5mM DTT、10% Glycerol)を用いて4 で透析を行った(1,000倍量の buffer で6時間、3回)。

### 1-2-14 リコンビナント DTA の作製

GST 融合 DTA タンパクを作製するため、pCAG-DTA (Fig.4)をテンプレートとして以下のプライマーを用い Pyrobest® DNA polymerase (TaKaRa) を使用し PCR で増幅し *Bam* H / *Eco* R により pGEX-2T (GE Healthcare) に DTA (WT、CRM197、K51E/E148K) を導入したプラスミドを作製した (Fig.12)。

	98	,5分	
	98	,30秒	} 35サイクル
5-B-DTA : CGC <u>GGA TCC</u> GGC GCT GAT	58	,30秒	
GAT GTT GTT GAT T	72	,30秒	
DTA (-): CCC <u>AAG CTT CGA ATT CGG</u> ATC	72	,7分	
CTC ATC GCC TG	4	,	

下線は *Eco* R、波線は *Hin* d、太下線は *Bam* H サイトを示す。

### 目的タンパク質の発現確認

それぞれのプラスミドを大腸菌 BL21 codon plus (DE3)-RIL 株

(Starategene) にトランスフォーメーションし得られたクローンについて IPTG でその発現を誘導し目的のタンパク質を確認した。

得られたクローン2種類を1mlのLB培地で前培養し(37℃、一晚)、翌日新鮮な培地で10倍希釈し30℃で2時間培養し発現誘導前のサンプルとして100μlの菌体を回収し20μlの2×sample buffer(0.1M Tris-Cl(pH6.8)、4% SDS、0.02% BPB、20% Glycerol、0.1M DTT)で懸濁した。その後、1mM IPTGを添加して、さらに30℃で2時間培養することで目的のGST融合タンパク質を誘導した。なおGST-DTA-CRM197のみ0.1mM IPTG 20℃で発現誘導を行った。発現誘導後のサンプルとして100μlの菌体を回収し20μlの2×sample bufferで懸濁した。さらに残りのサンプルは3,000rpm、15分遠心し菌体を回収し100μlのLysis buffer(0.35mg/ml Lysozyme、1% TritonX-100、5mM MgCl<sub>2</sub>、DNase (TaKaRa)70U/1ml、2mM PMSF(#273-27:nacalai tesque)、0.2mg/ml アプロチニン(#03346-84:nacalai tesque)、0.2mg/ml ペプスタチン(#4397:ペプチド研究所)、0.2mg/mlロイペプチン(#L-2884:SIGMA))で懸濁し、氷上で30分静置した。その後、超音波破碎を30秒×2回行い、15,000rpm、4℃、15分遠心し、上清を可溶画分として回収した。また、沈殿は200μlの2×sample bufferで懸濁し、不溶画分とした。それぞれについて、10μlをSDS-PAGE後CBB染色及びWestern解析により目的タンパク質の発現を確認した。

### GST 融合 DTA の精製

発現確認できたクローンについて培地を200mlにスケールアップし、同様に菌体を回収した。

50ml チューブ1本分の菌体に対し、15mlのLysis bufferで懸濁した後、氷上で30分間静置した。その後、超音波破碎を30秒、3回行い、8,200rpm、4℃、10分遠心し、上清をさらに30,000rpm、4℃、1時間で遠心した。上清を回収し、平衡化した1ml bed glutathione-Sepharose 4B(Amersham Bioscience)を加え、4℃で一晩ゆっくり攪拌した。翌日、それらをカラムに詰めて5mlのice cold PBS(-)で3回洗浄後、8mlのelution buffer(50mM Tris-HCl、20mM reduced glutathione(pH 8.0))で溶出した。溶出フラクションのうち、ピークフラクションを20%Glycerol/PBS(-)で透析し液体窒素で凍結後-80℃で保存した。

### 1-2-15 ADP リボシル化活性測定

15mM N-octylglycoside、7mM DTT、5.6mM Thymidine、92.5μBq

$^{32}$ P-NAD (#NEG023X:PerkinElmer) にラビットレティキュロサイト由来 EF-2 (大阪大学微生物病研究所, 目加田英輔博士より供与) 10 $\mu$ g、MKK-M Lysate 200 $\mu$ g 或いは、リコンビナント DTA 50 $\mu$ g を添加し 37 $^{\circ}$ C、10 分インキュベートした。Lysate を用いた場合には、その後 TCA 沈殿を行い生成した沈殿物を 10 穴吸引式 glass filter フォルダーを用いて 25mm glass filter (#1822-025:Whatman) に吸着させ、EF-2 に取り込まれた  $^{32}$ P-NAD の放射活性を液体シンチレーションカウンター (BECKMAN) で測定した。また、リコンビナント DTA を用いた場合には Cold の NAD (#N-0632:SIGMA) を過剰量加えることで反応を停止させ 10% SDS-PAGE ゲルで全量泳動し、ゲルドライヤーで乾燥させた。シグナルの検出は BAS 2500 system (FUJIFILM) を用いて行った。コントロールとしては、ジフテリア菌培養上清から精製した DT を 2 $\mu$ g 使用した。

### 1-2-16 Tg マウスの作製

#### トランスジーン の作製

pCAGGS に完全長の変異型毒素 (K51E/E148K) を *Eco* R で導入した pCAG-DTA+B-K51E/E148K (Fig.14) から *Sal* /*Pst* で切り出し、0.8% アガロースゲルから QIA quick Gel Extraction kit (QIAGEN) を用いて精製した。

#### 受精卵の採取

採卵予定日より 3 日前に雌マウス C57BL/6J 5 週齢に牝馬血清性腺刺激ホルモン (Pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG: 帝国臓器) を 5IU/匹腹腔内投与した。採卵予定日の 20 時間前にヒト絨毛性生殖刺激ホルモン (human chorionic gonadotrophin, hCG: 三井ゾーキ) を 5IU/匹腹腔内投与し、雄マウス C57BL/6J と同ケージにて飼育交配させた。翌朝雌マウスの卵管を切除し実体顕微鏡下にて受精卵を膨大部より採取して 1mg/ml のヒアルロニダーゼ (SIGMA) 培養液中で卵丘細胞を除去した後、受精卵を M2 培地中 (SIGMA) で洗浄した。さらにパラフィンオイルで覆われた M16 培養液 (SIGMA) 液滴中でインジェクションまで 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。

#### マイクロインジェクションと移植

1ng/ $\mu$ l に 10mM Tris/ 0.1mM EDTA (pH7.4) で希釈した DNA を受精卵の雄性前核中にインジェクションした。この卵を一晩 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 中で培養後、2cell を偽妊娠マウス Jcl:ICR の卵管に移植した。

### 1-2-17 マウス尾からのゲノム回収

3~4週齢になるマウスを親から離乳後、尾を約1cm切除した。1mlのLysis buffer (50mM Tris-HCl(pH 8.0)、0.1mM NaCl、20mM EDTA、1% SDS)にProteinase Kを100 $\mu$ g/mlになるように添加し55℃で混和し4時間から1日かけて完全に溶解した。その後フェノール・クロロホルム抽出を2回繰り返し、エタノール沈殿後70%エタノールで洗浄し適量のTEに一晩かけて溶解した。

### 1-2-18 Genomic PCR

マウス尾から回収したゲノムをテンプレートに、*rTaq*® DNA polymerase (TaKaRa)を用いてPCRを行った。用いたプライマーは以下に示す。

	98	,5分	
DT-F1: ACT AAA AGT GGA TAA TGC CG	98	,30秒	} 35サイクル
DT-R3: TTT TTG ATA GGG CCA TGC TC	58	,30秒	
	72	,30秒	
	72	,7分	
	4	,	

### 1-2-19 Southern 解析

マウスゲノム5 $\mu$ gを*Eco* R で完全消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動した。EtBrで染色しサテライトバンドによりゲノムの完全消化を確認した後、0.25M HClで加水分解処理し続いて1.5M NaOH、0.5M NaClで中和した。その後、0.4M NaOHでポジティブチャージのナイロンメンブラン (Hybond N+ : Amersham Bioscience) にアルカリトランスファーを行い、2 $\times$ SSC (0.3M NaCl、0.03M Na Citrate-2H<sub>2</sub>O (pH7.0)) でメンブランを洗浄した。メンブランへのDNAの固定は80℃で2時間 Baking 処理することにより行なった。

### プローブの調整

プローブはPCR (*rTaq*® DNA polymeraseを使用) により作製した。pCAG-DTA+B-K51E/E148Kをテンプレートとして使用し、以下のプライマーを用いて増幅した。約2Kbpのフラグメントを0.8%アガロースゲルから回収して使用した。プローブはRandom Primer DNA labeling kit ver.2 (TaKaRa)を用いて[<sup>-32</sup>P]dCTPで標識した。

	98	,5分	
	98	,30秒	} 35サイクル
CAG (+): TTC GGC TTC TGG CGT GTG AC	58	,30秒	
CAG (-): AAG GGG CTT CAT GAT GTC CC	72	,30秒	
	72	,7分	
	4	,	

### ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション、メンブレンの洗浄にはチャーチリン酸 buffer (0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, pH7.2) (Church G. *et al.*, 1984)を使用した。メンブレン 100cm<sup>2</sup>あたり5mlのハイブリダイゼーションbuffer(1M チャーチリン酸 buffer、1mM EDTA、7% SDS) で65℃, 5分間以上プレハイブリダイゼーション後、プローブを添加し65℃で16~20時間ハイブリダイゼーションを行った。65℃の洗浄液(40mM チャーチリン酸 buffer、1% SDS)で5分間洗浄を3回繰り返し最後に15分間洗浄した。シグナルの検出はBAS 2500 system (FUJIFILM)を用いて行った。

### 1-2-20 血球からの RNA 回収

マウスの血液から、ISOGEN-LS (NIPPON GENE)を利用しtotal RNAを調整した。マウスから採血する際には、EDTAを適量添加することで凝血を防いだ。また、血液の大半は赤血球でありサンプル中のタンパク質濃度が高いので、必要量のRNAを回収するために複数回に分けて採血を行い、さらにddH<sub>2</sub>Oで2倍に希釈してサンプルとして使用した。

### 1-2-21 RT-PCR

Total RNA 20μgを37℃で30分間 DNase (0.5U)処理しフェノール・クロロホルム抽出した。エタノール沈殿後、70%エタノールで洗浄し適量のDEPC水に溶解し、SuperScript II (Invitrogen)を用いて逆転写反応を42℃で50分間行った。反応液をRNase Hで処理したものをcDNAとして使用した。コントロールには、mouse GAPDHを使用した。使用したプライマーは以下に示した。変異型毒素については、DT-F1,DT-R3を用い同様の条件でPCR反応を行った。

mGAPDH 1sense: GCC GAA TTC ATG GTG AAG	98	,5分	
GTC GGT GTG A	98	,30秒	} 35サイクル
mGAPDH 1042anti: GCC GAA TTA TTG CTC	58	,30秒	
AGT GTC CTT GCT GG	72	,30秒	
	72	,7分	
	4	,	

DT-F1: ACT AAA AGT GGA TAA TGC CG

DT-R3: TTT TTG ATA GGG CCA TGC TC

### 1-2-22 Northern解析

10 $\mu$ gのtotal RNAを1%アガロース/6.7%ホルマリン変性ゲルで電気泳動しHybond-Nメンブレンに転写した。プローブを Random primer DNA labeling kit ver. 2.0 を用いて[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP でラベルし、チャーチリン酸buffer中でハイブリダイゼーションを65 で一晩行った。シグナルの検出はBAS 2500 system (FUJIFILM)を用いて行った。プローブはSouthern解析と同様のものを使用した。

### 1-2-23 組織凍結切片作製

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、各種組織を摘出後10%ホルマリン/PBSで一晩固定し、30% sucrose に置換し4 で一晩ゆっくり攪拌した。O.C.T.Compound (#4583:SAKURA)中で凍結後、クライオスタットにて8~10 $\mu$ mの切片を作製した。切片をPBS(-)で処理しO.C.T.Compoundを除去してからHE染色に使用した。

### 1-2-24 HE染色

ヘマトキシリン(#131-09665:Wako)で5分染色後、流水で10分から一晩かけて水洗後、ddH<sub>2</sub>Oに浸す。70%、85%、92.5%、96%、100%それぞれの濃度のエタノール順に5分ずつ浸した。エオジン(#050-06041:Wako)で1分染色後、適度な濃さになるまで70%エタノールで洗浄した。100%エタノールで3回洗浄後、さらに100%エタノールに5分×3回\*浸した。Hemo-Deに5分×2回(#CS-1001:藤沢薬品工業株式会社)浸した後、マウントクイック(大道産業株式会社)を用いて封入し、顕微鏡(COOL SCOPE:Nikon)にて観察を行った。

\* ) 無水エタノールを作製するために Molecular sieves 3A 1/8 (#133-08645:Wako)を添加した。

### 1-2-25 マウスのDT免疫

変異型 DT-Tg マウス(3M3)、及びコントロールとしてその同腹子(Tg-)について、3匹ずつ50 $\mu$ g/kgのDTを Freund's complete adjuvant containing *Mycobacterium Butyricum* at 0.05% (DIFCO: Detroit, MI)を用いて免疫した。

2週間後に血液を回収しその血清をサンプルとして使用した。



## 1-3.結果

### 1-3-1 5 $\mu$ g/kg の DT 投与で抗体を産生する

マウスの体内で毒素に対する抗体が産生するのか、また抗体ができる場合にはどの程度の DT 投与量と期間を要するのかを調べるために、近交系マウス BALB/cA 及び C57BL/6J に DT の連続投与を行った。3 日毎に1ヶ月間(計 10 回)DT を投与し、回収した血清を用いて ELISA を行った。その結果、どちらの系統においても 50 $\mu$ g/kg を投与した場合には、投与開始 2 週間以降で全ての個体で抗体を産生していることが明らかになった。5 $\mu$ g/kg で連続投与を行った場合にも個体差は見られるが、抗体を産生することを確認した。しかし、0.5 $\mu$ g/kg の DT を同様に投与した場合は1ヶ月の毒素投与後でも抗体の産生は全く確認できなかった (Fig.2)。

### 1-3-2 マウス体内で産生した抗体は DT の中和抗体として作用する

次に、抗体を産生しているマウス体内で、投与した DT が実際に抗体により中和され DT 活性が消失しているのかどうかを確認した。C57BL/6J 系統において、50 $\mu$ g/kg、5 $\mu$ g/kg、0.5 $\mu$ g/kg 及び PBS (-) を 1 ヶ月にわたり連続投与 (計 10 回) したマウス (Fig.2) に再び 50 $\mu$ g/kg の DT を単回投与し 18 時間後にその血清を回収した。投与した DT が中和抗体により活性を消失した場合には、タンパク質合成阻害は起こらない。そこで、DT 感受性細胞の培養液に回収した血清を添加し、タンパク質合成量を測定することで DT 活性の指標とした。抗体を産生しなかった PBS (-) や 0.5 $\mu$ g/kg の DT を連続投与したマウスはタンパク質合成が著しく阻害を受けたことから血中に DT が残っていることが示された。一方、抗体を産生していた 5 $\mu$ g/kg や 50 $\mu$ g/kg の DT を連続投与したマウスの血清ではタンパク質合成が阻害されなかったことから、投与した DT が抗体により中和されていることが明らかになった (Fig.3)。

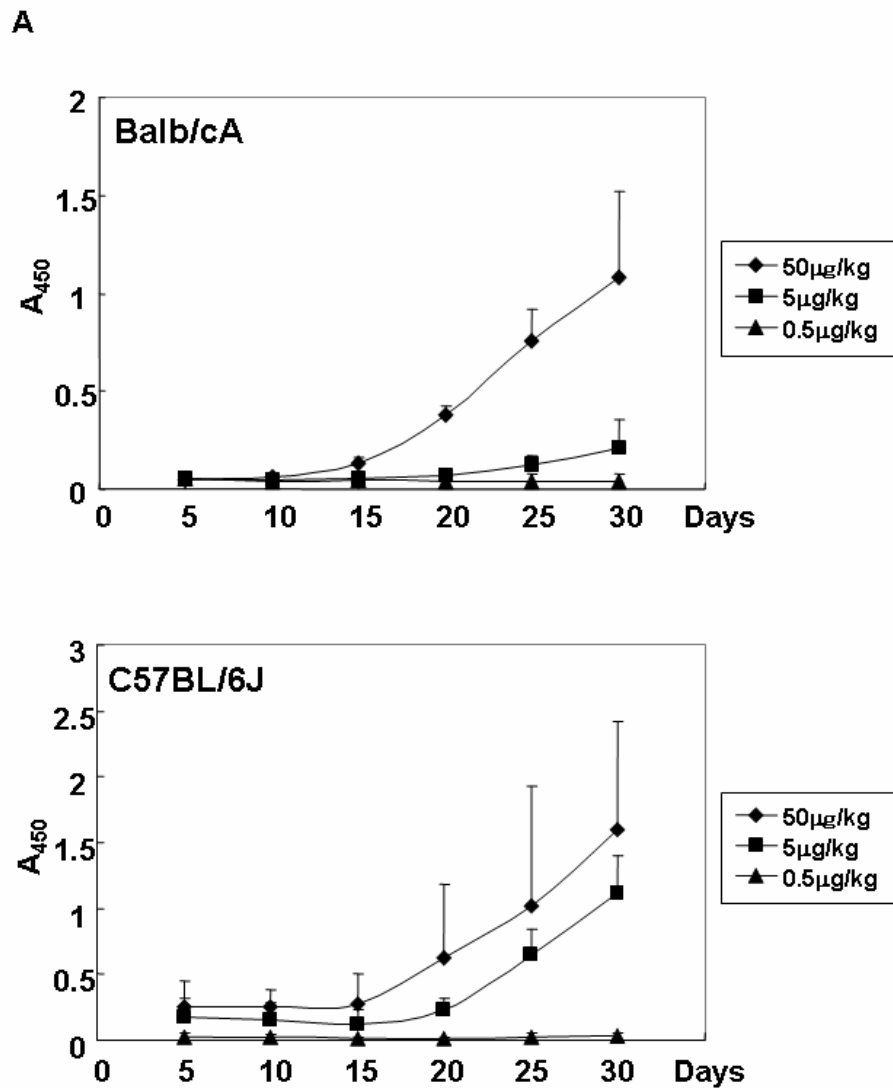
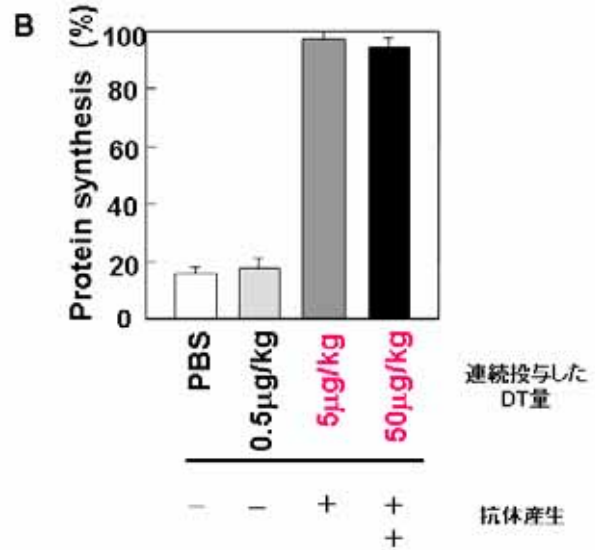
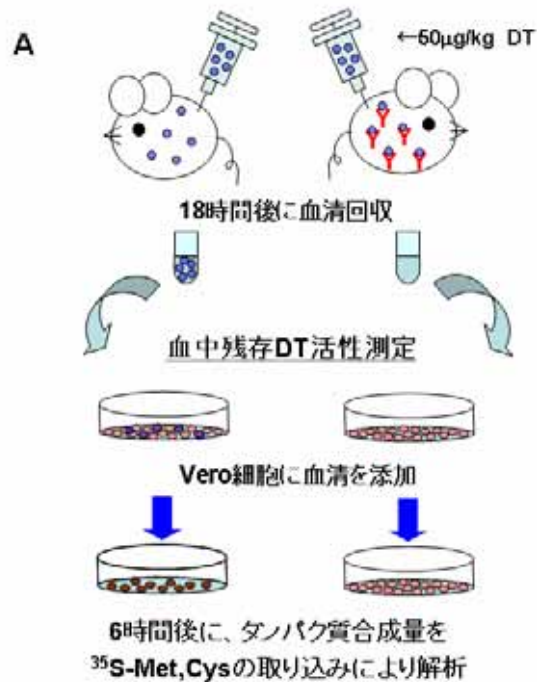


Fig.2 近交系マウス Balb/cA 及び C57BL/6J における DT 連続投与

0.5µg/kg、5µg/kg、50µg/kg の DT をそれぞれ雌マウス 5 匹ずつに 3 日毎に投与し、5 日毎に血清を回収した。Balb/cA は血清を 1,000 倍希釈、C57BL/6J は 100 倍希釈して使用し ELISA を行った。



**DT活性があればタンパク質合成が阻害**

**Fig.3 DT 連続投与後の血中残存 DT 活性測定**

**A. 血中残存毒素活性測定方法**

それぞれの濃度で連続投与を行った C57BL/6J マウスに、新たに 50 $\mu$ g/kg の DT を単回投与し、18 時間後に血清を回収した。この血清を DT 感受性 Vero 細胞に添加し <sup>35</sup>S の取り込みによるタンパク質合成量を測定した。投与した DT が抗体により中和された場合には、DT 活性が消失しタンパク質合成阻害は起こらない。

**B. 血中残存毒素活性**

血清を加えなかった場合の値を 100%として、それぞれの血清を加えた時の Vero 細胞タンパク質合成量を示す。(n = 3、グラフは平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。)

### 1-3-3 変異型毒素の細胞毒性解析

#### **K51E/E148K は完全に毒素活性を消失した変異体である**

##### 酵母細胞において

DT を自己タンパクとして認識し、DT に対して免疫寛容となる Tg マウスを TRECK 法に応用するためには、マウス体内で発現している DT が投与した DT の受容体への結合を阻害しない必要がある。そのため、トランスジーンはサイトゾル内で発現させることにした。しかし、DT は 1 分子でも細胞内に入ると細胞を死に至らしめるため完全に毒素活性を消失した DT を用いる必要がある。そこで、まず酵母を用いて活性消失型毒素の検討を行った。一般的に細胞毒性が低下した変異型として知られている CRM197、K51E/E148K、及び WT の DTA をもつ pMGU10-DTA ベクター (Fig.5) を酵母 FY24 (EF-2 野生株) に酢酸リチウム法を用いて導入した。得られたクローンをガラクトース培地にスポットし生育に影響が見られるかどうかを検証した。

その結果、WT の発現をガラクトースにより誘導した場合には、生育が著しく抑制された。これに対して、K51E/E148K では Mock の場合と同様に成育阻害は全く認められなかったさらに興味深いことに、これまで無毒であると報告されていた CRM197 を導入した株においても WT の場合と同様に、強い生育阻害が認められた。(Fig.6A)。

##### 動物培養細胞において

次に、マウス個体での応用を検討しているため、動物細胞由来細胞株を用いてそれぞれの変異型毒素の細胞毒性について検討を行った。まず、Ltk-細胞、COS7 細胞、HeLa 細胞それぞれについてリポフェクション法によりルシフェラーゼ遺伝子を持つ pCAG-GL3 と pCAG-DTA (Fig.4) を共発現させた。変異型 DTA に毒性があればタンパク質の合成阻害が起こるためルシフェラーゼの合成も阻害される。そのため、ルシフェラーゼ活性をモニターすることでその細胞毒性について解析を行うことが可能になる (Zhao L. *et al.*, 2005)。酵母の場合と同様、全ての培養細胞において、K51E/E148K を導入した場合には、タンパク合成が阻害されておらず、毒性が極めて低い変異体であることが明らかになった。これに対して、CRM197 では著しくタンパク質合成が阻害されており細胞毒性が認められた (Fig.6B)。また、Ltk-細胞の Lysate を用いた Western 解析では、K51E/E148K の場合のみ DTA の発現を確認することができた (Fig.6C)。

さらに、それぞれの変異型 DTA を pMXc ベクターに導入しマウス NIH3T3 細胞にインフェクションを行った。このウイルスに感染した細胞は、DTA と GFP とを

同時に発現しているため、GFP の蛍光を観察することで変異型 DTA の細胞毒性について解析することができる。DTA に細胞毒性があれば安定発現株を取得することは困難であると考えられ、その様な場合には Tg マウスの作製も非常に難しいと考えられる。そこで、約 1 ヶ月継代を繰り返し安定発現株の取得が可能であるかどうか検討した。顕微鏡観察の結果、K51E/E148K を導入した細胞では CRM197 の場合と比較して、強い GFP 蛍光を確認することができた。また、FACS によりマーカーとなる GFP 陽性細胞の割合を測定したところ、CRM197 と比較して K51E/E148K を導入した細胞の方が 5 倍程度多いことが明らかになった (Fig.8)。なお、Mock をインフェクションした細胞で GFP 陽性細胞が多くなっているのは IRES 上流に遺伝子を含んでいないためすぐに下流の GFP が読まれ転写効率が上がっているためであると考えられる。

### EF-2 変異株では CRM197 による細胞毒性は認められない

CRM197 による EF-2 の ADP リボシル化はこれまで報告されていないため、今回、新たに見出した CRM197 の細胞毒性が何に起因するのか明らかにするため、EF-2 の構造遺伝子に変異を持つ株を用いて検討を行った。CHO-K1 細胞由来 KEE1 は EF-2 に G717R 変異を持つことで DT による ADP リボシル化を受けにくいと報告されている (Kohno K. *et al.*, 1985)。そのため、CRM197 の細胞毒性が EF-2 の ADP リボシル化に関与するのであれば KEE1 (G717R) では CRM197 によるタンパク質合成阻害が認められないはずである。そこで先程と同様に、ルシフェラーゼ遺伝子と変異型 DTA を共発現させ、その細胞毒性について解析を行った。その結果、CHO-K1 に CRM197 を導入した場合には、これまで同様、著しいタンパク質合成阻害が認められたが、KEE1 (G717R) ではタンパク質合成は全く阻害されなかった。しかし、KEE1 に WT を導入した場合には、未だ強い細胞毒性を持っていることが明らかとなった (Fig.9A)。その細胞抽出液を用いた Western 解析を行ったところ、CHO-K1 では確認できなかった CRM197 の発現を KEE1 (G717R) では確認することができた。しかし、KEE1 (G717R) でも WT の発現を検出することができなかった (Fig.9B)。

また、同様の傾向は酵母においても観察された。哺乳動物細胞 EF-2 の G717R に相当する EF-2 変異をもつ SE2-GR (G701R) のサイトゾル内で変異型 DTA の発現をガラクトースにより誘導したところ、CRM197 を導入した場合には Mock や K51E/E148K と同程度まで生育が回復したが、WT を導入した場合には、まだ若干の生育阻害が認められた。一方、EF-2 のジフタמיד形成に必須である His に変異を持つ MKK-M (H699M) では WT の DTA による生育阻害は全く認められなかった (Fig.9C)。

### **MKK-M(H699M)でのみ WT の DT 発現を確認することができる**

KEE1(G717R)において、DTAのWTにまだ強い細胞毒性が認められたため、G717R変異を持つEF-2ではDTによるADPリボシル化を完全に回避することができないことが考えられた。そこで、酵母におけるEF-2の構造変異やジフタמיד形成に関わる修飾酵素に変異を持つ株を用いて変異型DTAの細胞毒性についてさらに解析を行った。EF-2修飾酵素のdph2、dph5(Fig.10A参照)それぞれの機能欠損株であるLMY11(dph2)、LMY10(dph5)とEF-2の構造遺伝子に変異を持つMKK-M(H699M)、SE2-GR(G701R)にWT及び変異型DTAを導入しDTAの発現について解析した。

得られたクローンからタンパク質を回収しWestern解析を行ったところEF-2修飾酵素を欠損したLMY11(dph2)、LMY10(dph5)において、WTのEF-2を持つFY24と同様にCRM197の発現を検出することはできなかった。また、KEE1(G717R)ではCRM197の発現を検出することができたために、KEE1(G717R)に相当する変異を持つSE2-GR(G701R)でWestern解析によりその発現が検出可能であることが期待されたが、予想に反してSE2-GR(G701R)でCRM197の発現を検出することはできなかった。そして、MKK-M(H699M)においてのみCRM197とWTの発現を検出することができた(Fig.10B)。

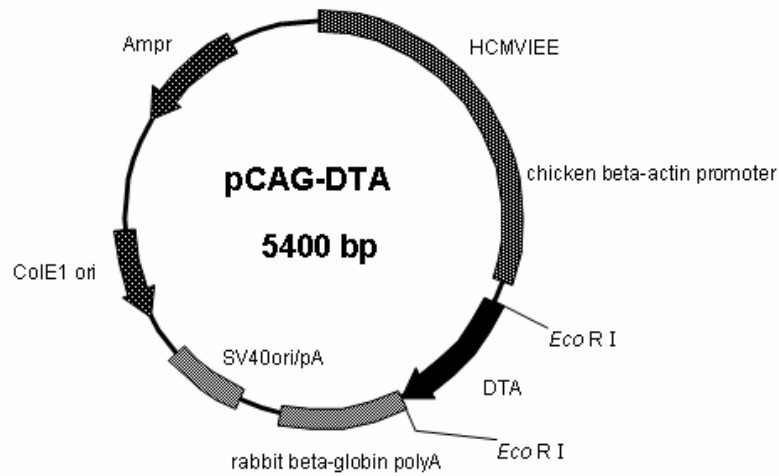
### **CRM197及びK51E/E148KはともにEF-2をADPリボシル化する**

EF-2変異株であるMKK-M(H699M)でCRM197の発現が認められたため、CRM197の細胞毒性がEF-2のADPリボシル化に関与する可能性が考えられた。そこで、実際にCRM197がEF-2をADPリボシル化するかどうかを明らかにするために、WesternによりWTとCRM197の発現が確認できたMKK-M(H699M)のLysateを用いてリボシル化アッセイを行った。サンプルは、37℃で20分反応後に等量の20%TCAを加えて反応を停止し液体シンチレーションカウンター(BECKMAN)により測定を行った。その結果、WTのDTAを導入した株のLysateでEF-2のリボシル化活性を検出することができた。しかし、CRM197を導入した株では、リボシル化活性は全く検出されなかった(Fig.11)。この結果は、これまでのCRM197に関する報告と一致している。しかし、CRM197のリボシル化活性がWTと比べて低いためLysate中のCRM197の濃度ではin vitroのアッセイにおける、リボシル化の検出が困難であった可能性も考えられた。

そこで、次にリコンビナントDTA(WT、CRM197、K51E/E148K)を用いてADPリボシル化活性を調べた。リコンビナントDTAは、それぞれGST融合型DTA(Fig.12)を導入したBL21株をIPTGで発現誘導させ回収した(Fig.13A)。GST-DTAとラビットレティキュロサイトから精製したEF-2を用いて30℃、10分反

応後 SDS-PAGE により分画しオートラジオグラフィーにより検出を行った。

その結果、予想どおり WT よりは低いですが、CRM197 に EF-2 を ADP リボシル化する活性があることを見出した。さらに興味深いことに、酵母や培養細胞において細胞毒性の見出されなかった K51E/E148K にも CRM197 よりさらに弱いですが ADP リボシル化活性が残っていることが明らかになった (Fig.13B)。



GAATTC-ACC **ATG** GGC GCT GAT GAT GTT GTT GAT TCT TCT - - - TGA GGA TCC GAA TTC  
*Eco* R I *Bam* H I *Eco* R I

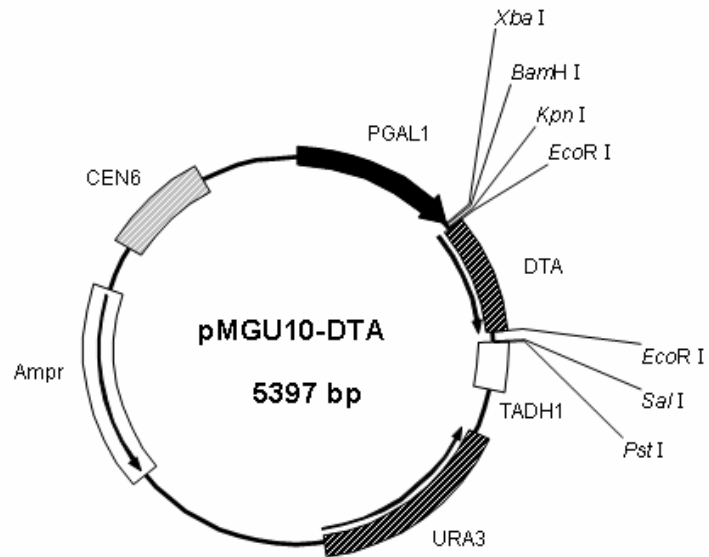
DTA : WT  
 CRM197(G52E) G52 (ggg) → gag  
 K51E/E148K K51 (aaa) → gaa , E148 (gaa) → aaa

Fu, H., S. R. Blanke, L. C. Mattheakis, and R. J. Collier. 1997.  
 Adv. Exp. Med. Biol. 419:45-52.

**Fig.4 変異型 DTA 培養細胞発現プラスミド**

培養細胞での DTA 過剰発現プラスミド。DTA 細胞毒性解析に使用した。



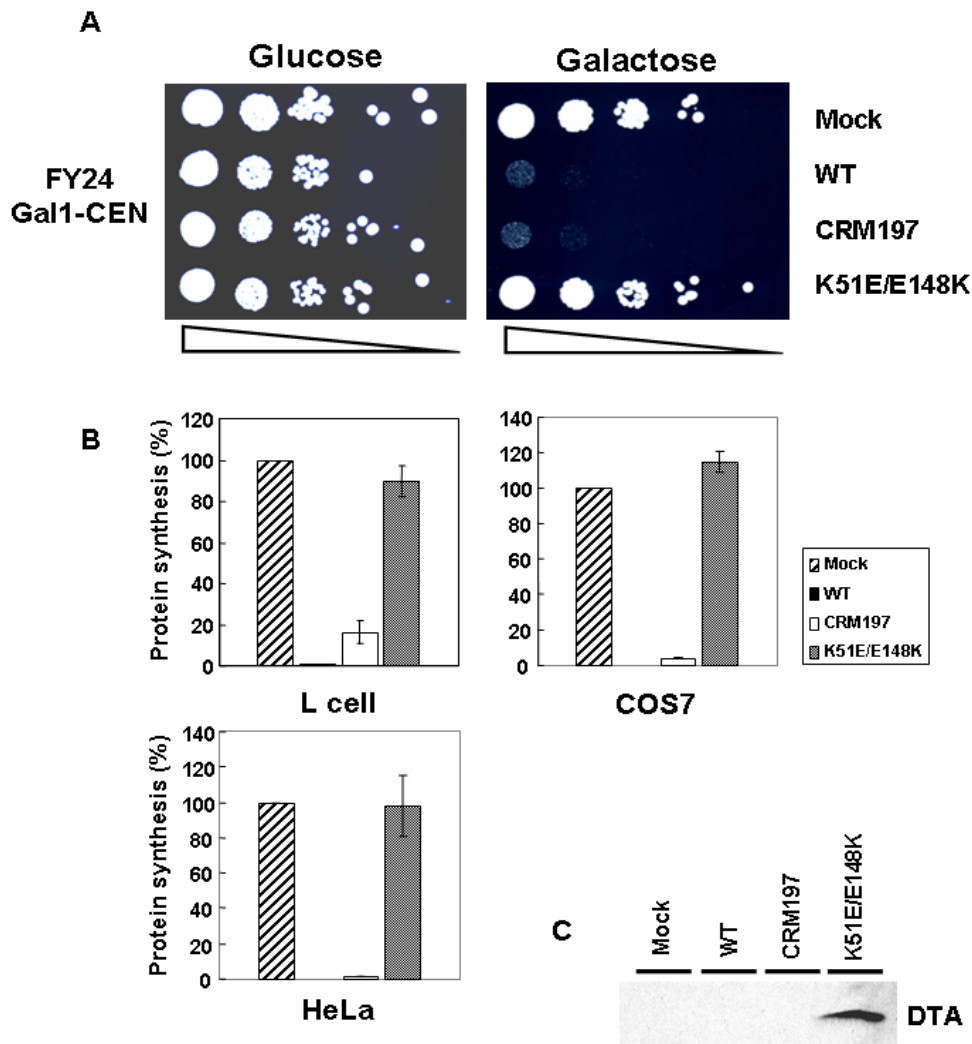


GAATTC-ACC **ATG** GGC GCT GAT GAT GTT GTT GAT TCT TCT AAA TCT TTT... TGA GAATTC  
 EcoR I EcoR I

DTA : WT  
 CRM197 (G52E)  
 K51E/E148K

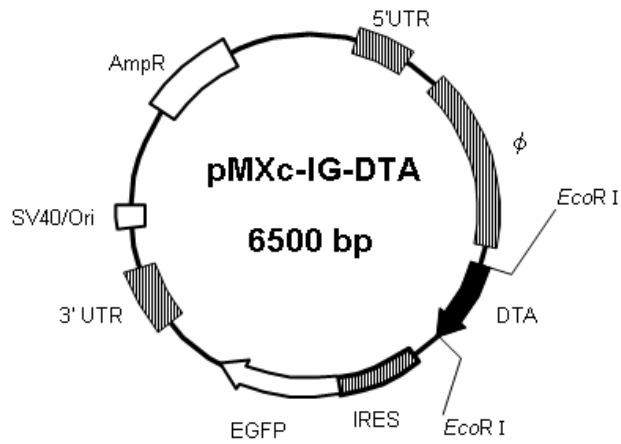
**Fig.5 変異型 DTA 酵母発現プラスミド**

酵母におけるガラクトース誘導型 DTA 発現プラスミド(CEN 型)。酵母における DTA の細胞毒性解析に使用した。



**Fig.6 変異型 DTA の細胞毒性解析**  
(酵母及び培養細胞における変異型 DTA の細胞毒性解析)

- A. 野生型 EF-2 を持つ酵母 FY24 に変異型 DTA を導入しガラクトースによりその発現を誘導した。酵母培養液を 10 倍ずつ段階希釈しグルコース、ガラクトースそれぞれの培地にスポットした。
- B. 各種培養細胞に変異型 DTA 遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子と共発現させトランスフェクション 24 時間後にタンパク質を回収した。縦軸は Mock のルシフェラーゼ活性を 100%としたそれぞれのタンパク質の合成量を示しており、毒素活性が残っていればタンパク質合成量は低下する。n=3、エラーバーは標準偏差を示す。
- C. B において細胞毒性試験を行った L cell の Lysate を用いた DT 抗体による Western 解析 (Total Protein は 30 $\mu$ g を使用)。

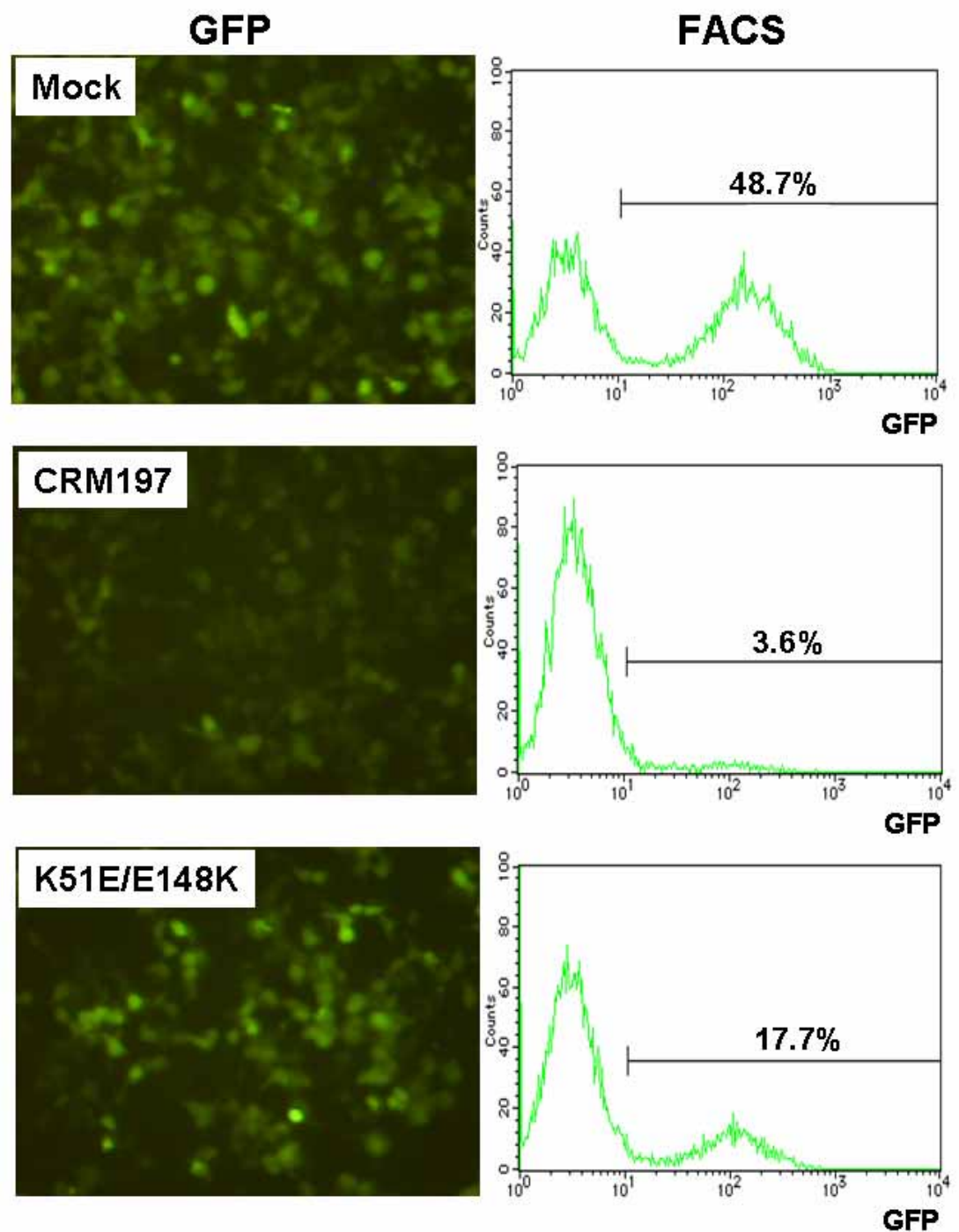


GAATTC-ACC **ATG** GGC GCT GAT GAT GTT GTT GAT TCT TCT AAA TCT TTT-... TGA GAATTC  
 EcoR I EcoR I

DTA : WT  
 CRM197 (G52E )  
 K51E/E148K

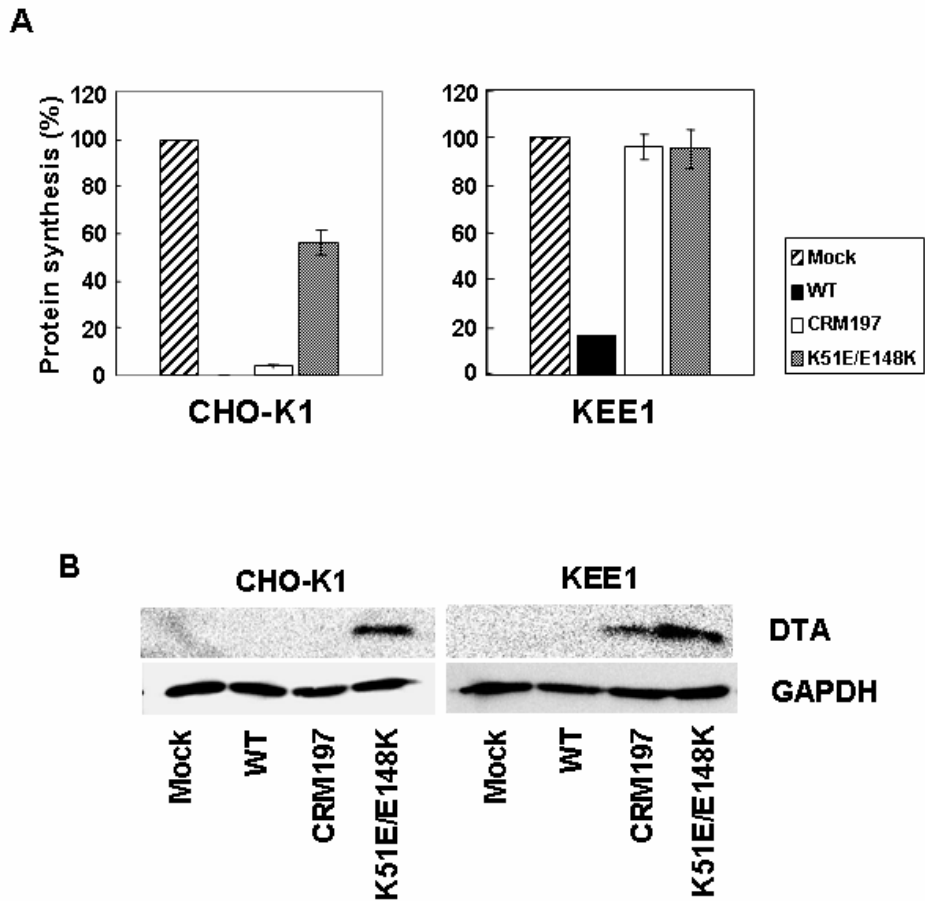
**Fig.7 変異型 DTA 発現ウイルスペクター**

IRES (Internal ribosome entry site) と呼ばれる配列の前後に 2 つの遺伝子を組み込めるバイシストロニックウイルスペクター。DTA と GFP を同時に同じ場所で発現させることが可能である。



**Fig.8 変異型 DTA の細胞毒性解析**

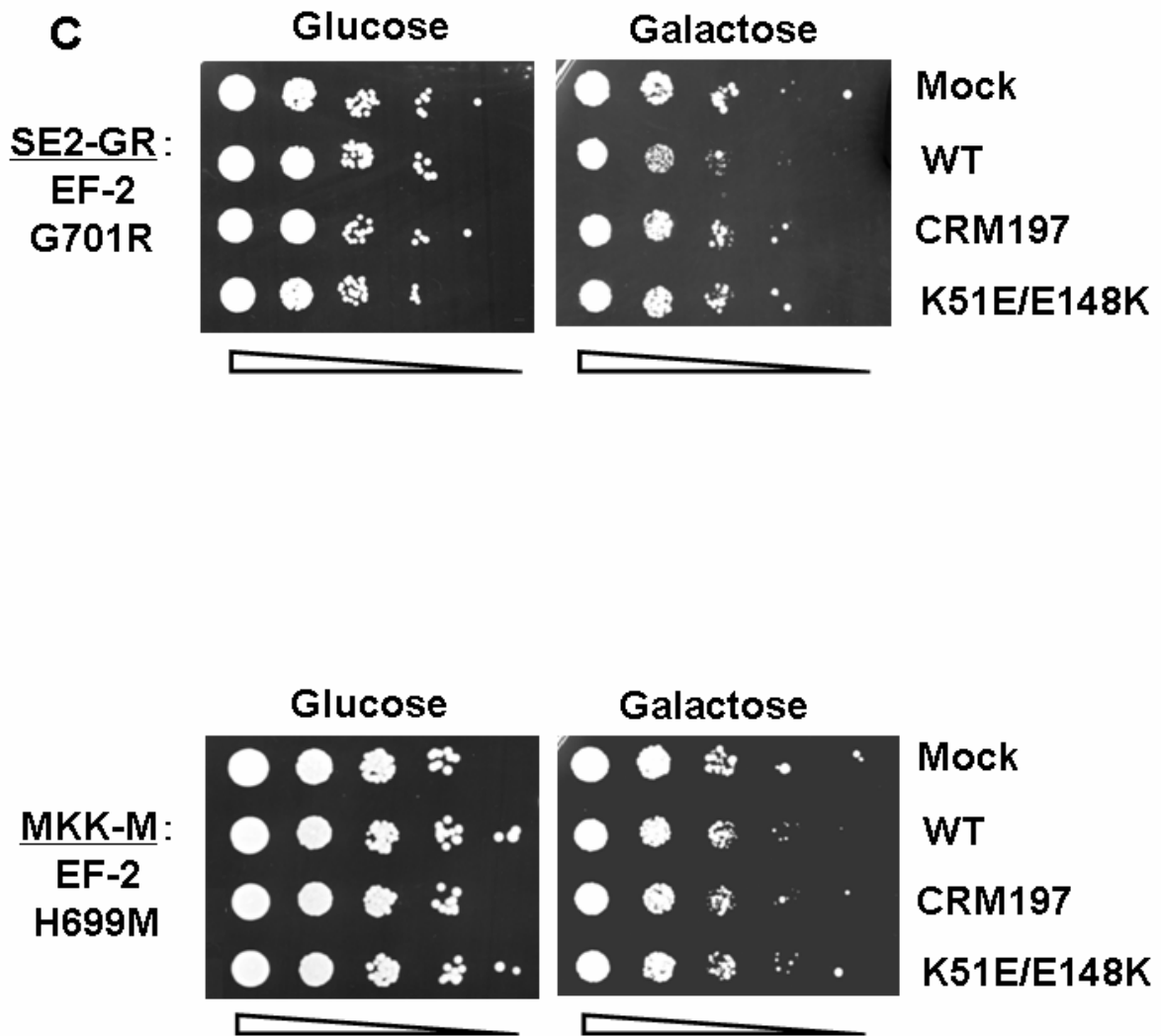
変異型 DTA と GFP を共発現するウィルスベクターを用いてマウス NIH3T3 細胞にインフェクションを行った。継代を繰り返し、インフェクション 1 ヶ月後に FACS 解析により GFP 陽性細胞の割合を測定した。



**Fig.9A, B CHO-K1 由来 EF-2 変異 KEE1 細胞における変異型 DTA 細胞毒性解析**

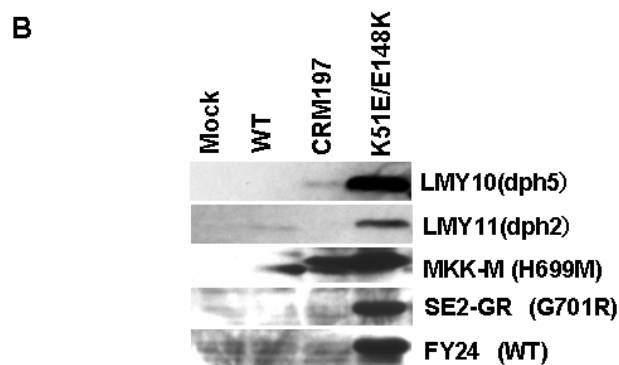
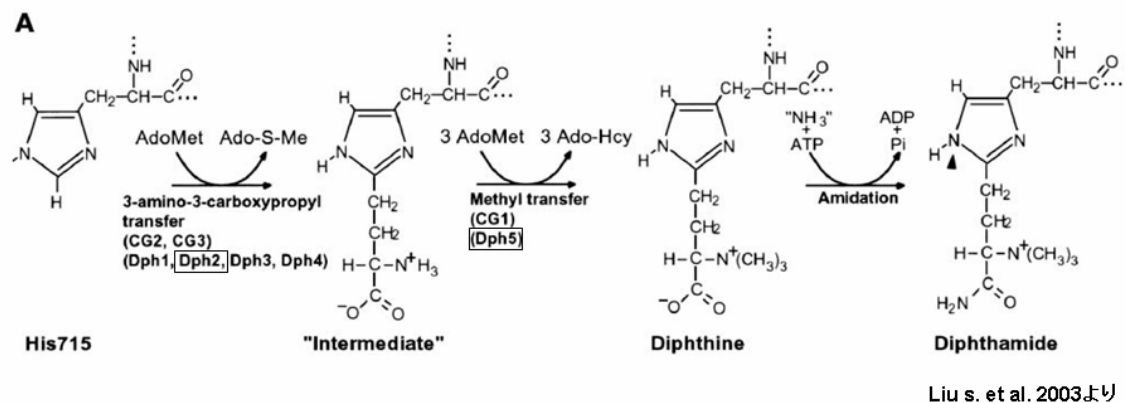
A. CHO-K1 及び KEE1(G717R) に変異型 DTA とルシフェラーゼ遺伝子を共発現させた。トランスフェクション 24 時間後の Mock のルシフェラーゼ活性を 100% としてタンパク質合成量を示した。n=3、エラーバーは標準偏差を示す。

B. A において細胞毒性試験を行った L cell の Lysate を用いた DT 抗体による Western 解析 (Total Protein は 30 $\mu$ g を使用)。



**Fig.9C 酵母 EF-2 変異株における変異型 DTA 細胞毒性解析**

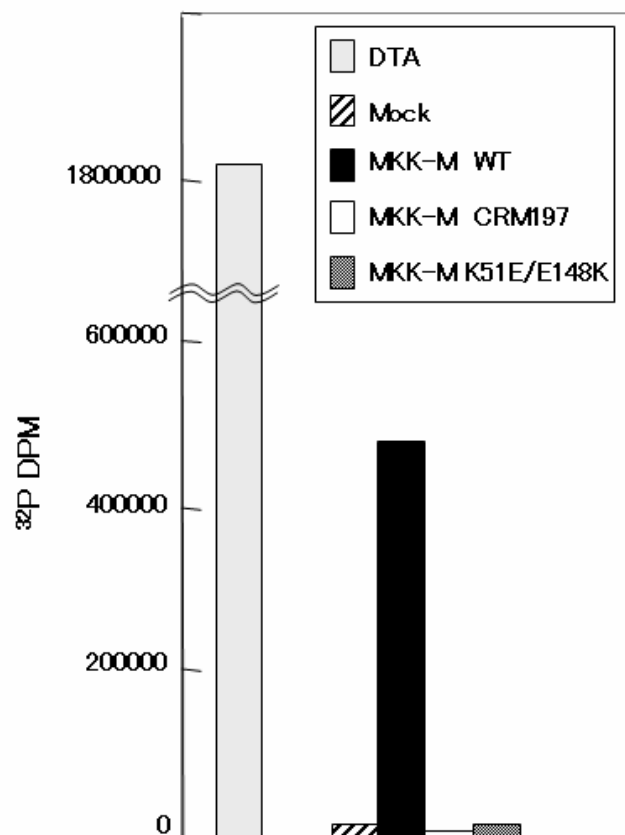
C. EF-2 に G701R 変異を持つ SE2-GR 及び、H699M 変異を持つ MKK-M について変異型 DTA を導入しガラクトースによりその発現を誘導した。酵母培養液を段階希釈しグルコース、ガラクトースそれぞれの培地にスポットした。酵母における EF-2 の G701R 変異は哺乳類 EF-2 の G717R に相当する。



**Fig.10 EF-2 修飾酵素変異株及び EF-2 変異株における変異型 DTA の発現解析**

A. 哺乳細胞における EF-2 のジフタמיד形成過程。H715 は酵母の H699 に相当。

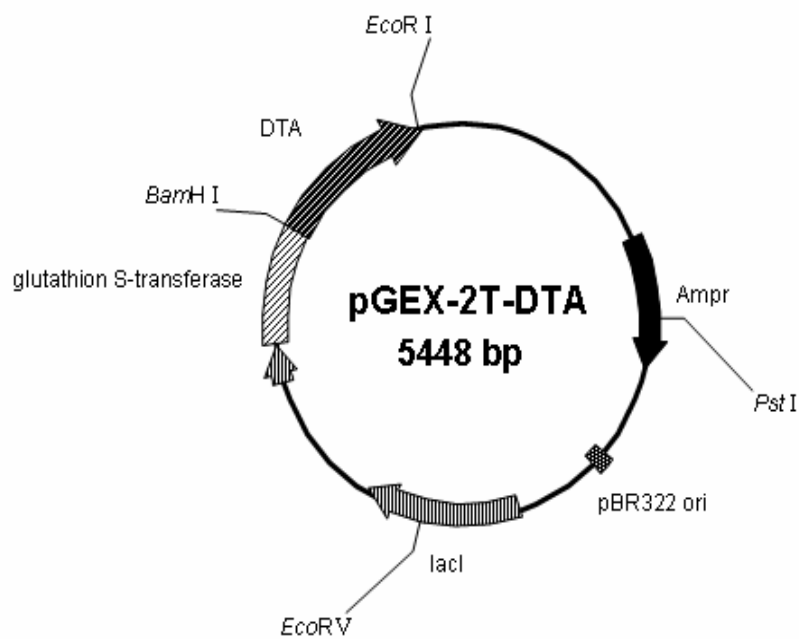
B. EF-2 修飾酵素欠損株及び EF-2 変異株のサイトゾル内で DTA を過剰発現させた。それぞれの菌株から回収したタンパク質 50 $\mu$ g を DT 抗体による Western 解析に使用した。



**Fig.11 MKK-M(H699M) Lysate を用いた ADP リボシル化活性測定**

EF-2 10 $\mu$ g と Lysate 200 $\mu$ g を用いて ADP リボシル化アッセイを行い、TCA 沈殿後 EF-2 に取り込まれた <sup>32</sup>P-NAD を液体シンチレーションカウンターにより検出した。コントロールとしてはジフテリア菌培養上清から精製した DT を 2 $\mu$ g 使用した。

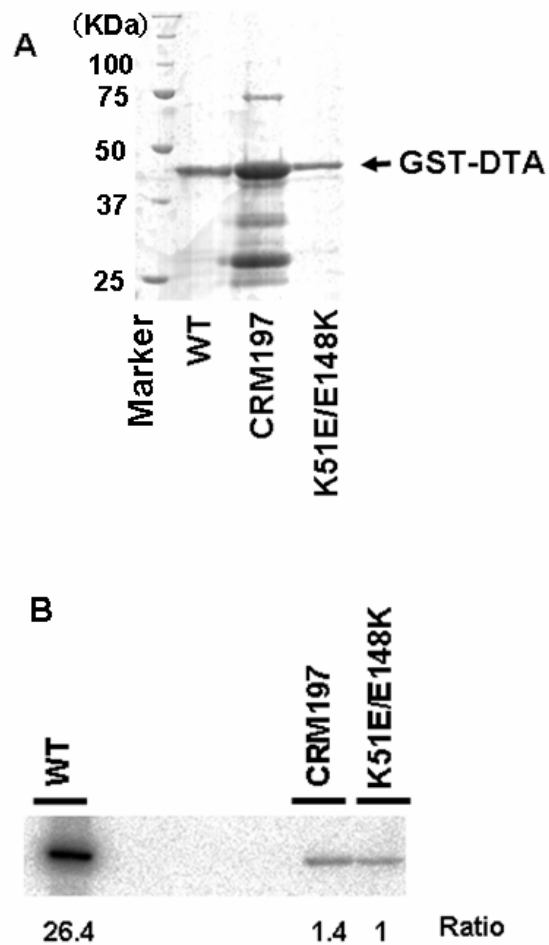




**DTA: WT**  
**CRM197(G52E)**  
**K51E/E148K**

**Fig.12 GST 融合 DTA 発現 プラスミド**

このプラスミドを発現する大腸菌から精製した GST-DTA は ADP リボシル化 活性 測定に使用した。

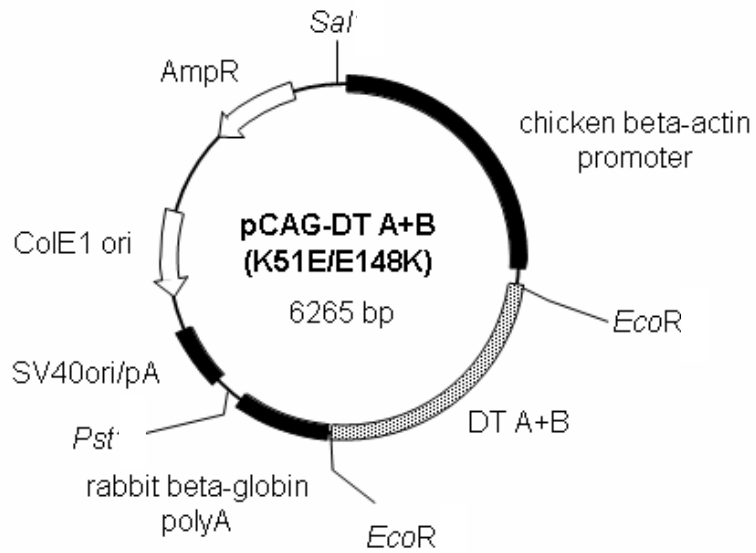


**Fig.13 リコンビナント DTA を用いた ADP リボシル化アッセイ**

- A. 精製した GST-DTA タンパクの CBB 染色。精製したリコンビナント DTA は EF-2 の ADP リボシル化アッセイに使用した。WT、K51E/E148K は 500ng を CRM197 は約 30 $\mu$ g を泳動した。
- B. リコンビナント DTA とラビットレティキュロサイト由来 EF-2 を用いた ADP リボシル化アッセイ。37 で 10 分間処理し SDS-PAGE により分画した。リコンビナント DTA はそれぞれ 50 $\mu$ g ずつ、EF-2 は 10 $\mu$ g を使用した。WT は系の約 1/10 を、その他は全量を泳動した。

#### 1-3-4 K51E/E148K 変異型毒素 Tg マウスの作製

DT を自己タンパクとして認識し、DT に対する免疫寛容を獲得するマウスを作製するため、恒常的に全身で発現する CMV/ $\beta$ アクチンプロモーターを用いた。また、TRECK 法で投与する DT は完全長のものを使用する。そこで、B フラグメントに対する抗体産生の可能性を除去するために完全長の活性消失型 DT (K51E/E148K) (Fig.14) を発生初期より発現するマウスの作製を行った (Fig.15A)。C57BL/6J $\times$ C57BL/6J 受精卵へのマイクロインジェクションの結果生まれてきたマウスについて、Genomic PCR と Southern 解析によりトランスジーンの導入を確認し、5 ラインを取得した。ファウンダーマウスの血液から Total RNA を回収し、RT-PCR を行うことで変異型 DT の発現について調べ、GAPDH をコントロールとして用いた。その結果、3M3、4F7 の 2 ラインで RT (Reverse transcriptase: 逆転写酵素) を加えた場合のみ、特異的な遺伝子の増幅を確認した。なお 3M3 は、4F7 よりもバンドが薄かったため発現量も低いと考えられる (Fig.15B)。さらに、3M3 の各組織よりタンパク質及び RNA を回収し変異型 DT の発現を確認したところ、調べた限り全ての組織においてその発現を確認することができた (Fig.15C)。4F7 については、トランスジーンを持つ F1 が生まれなかったため、以降の解析には 3M3 を使用した。この変異型 DT-Tg マウスが通常飼育下で野生型マウスと比較して異常があるかどうかを解析するため Tg マウス (3M3) 及び同腹子 (Tg-) の 8 週齢雄マウスについて 4 匹ずつ約 2 ヶ月に渡り体重の計測を行った。その結果、3M3 と Tg-との間に優位な差は認められなかった (Fig.16)。また、組織学的にも異常があるかどうかを解析するために、Tg マウスでトランスジーンが発現が高かった肺、心臓、肝臓、腎臓について凍結切片を作製し HE 染色を行った。その結果、トランスジーンを高発現していた組織での組織学的な異常は全く認められなかった (Fig.17)。



DT-A+B: 1.5Kbp

**Fig.14 完全長 K51E/E148K 変異型 DT 発現プラスミド**

*SalI* / *PstI* で切り出し精製したフラグメントをトランスジーンとして使用した。

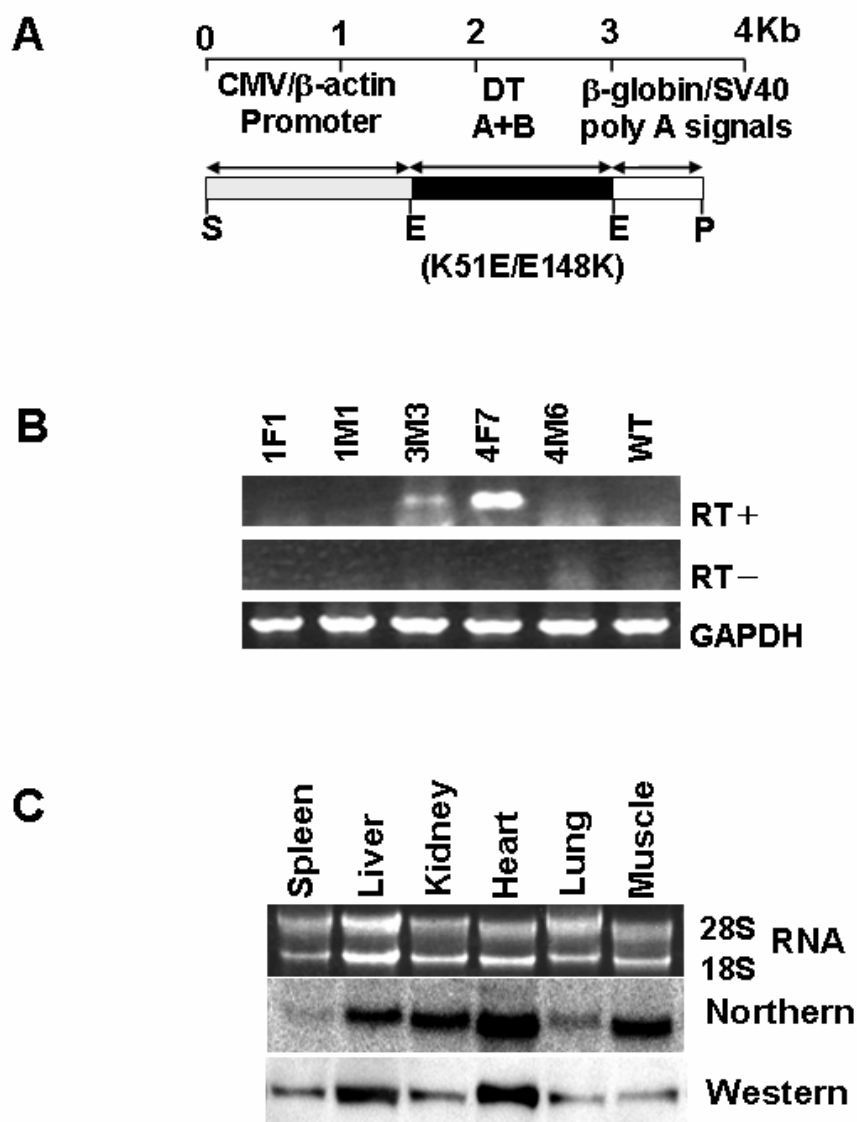


Fig.15 K51E/E148K 発現 Tg マウスの作製及びトランスジーンの発現解析

A. 使用したトランスジーンのコストラクト S: *Sal*、E: *Eco* R、P: *Pst*

B. 血球を用いた RT-PCR によるトランスジーン発現確認。

C. 3M3 ラインの各種組織におけるトランスジーン発現解析。Total RNA 10 $\mu$ g Total Protein 30 $\mu$ g 使用。Western 解析には DT 抗体を使用した。

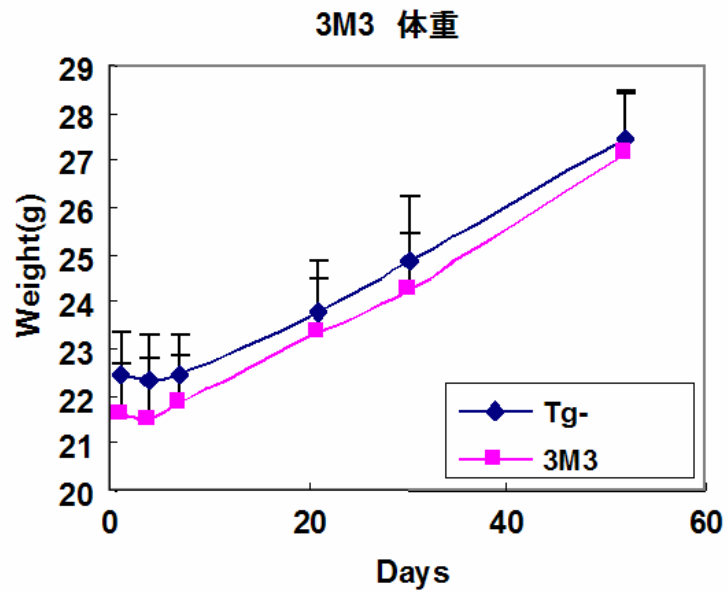
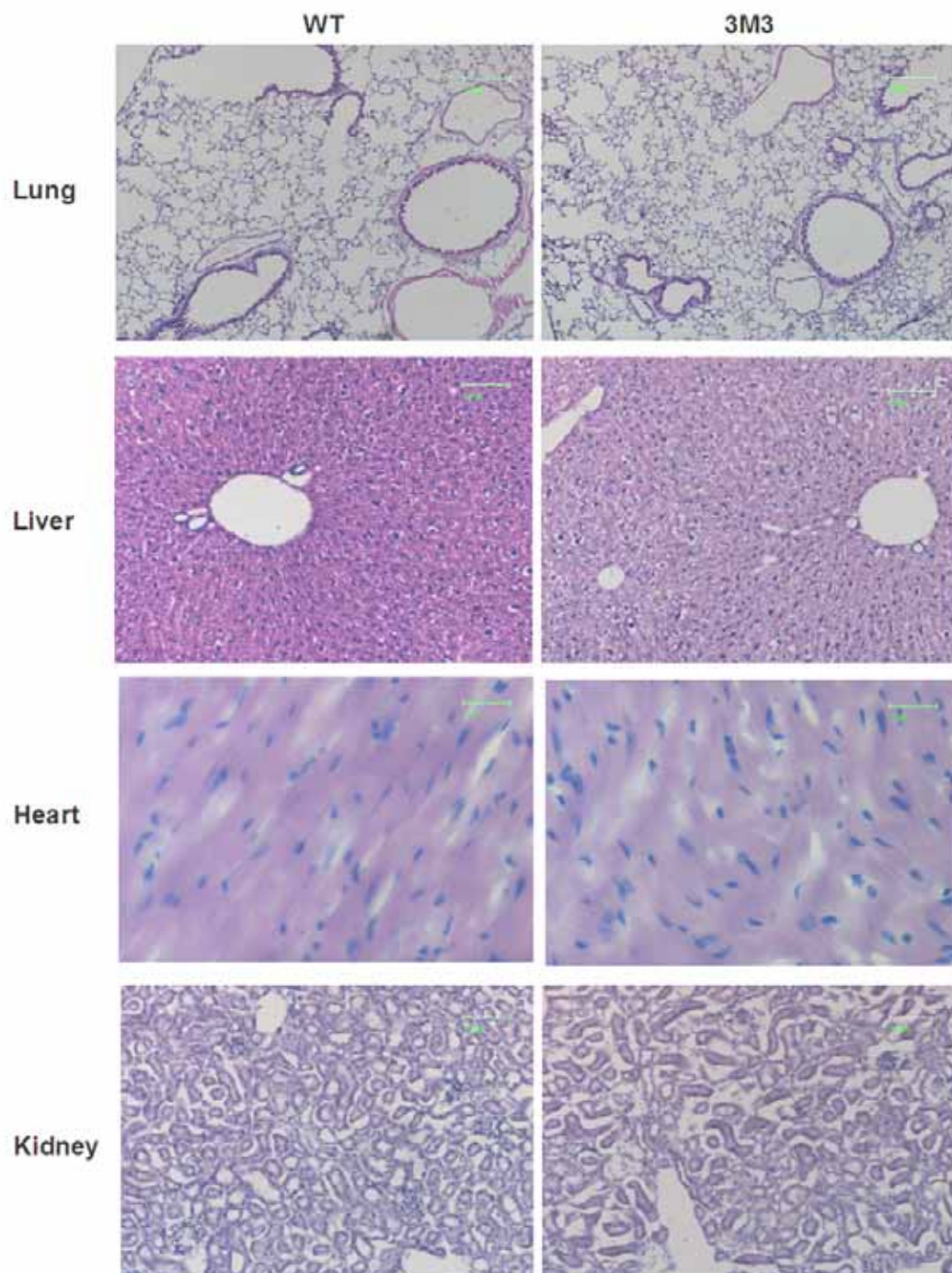


Fig.16 3M3 及び同腹子の体重推移

3M3 と Tg-(8 週齢、雄) について約 2 ヶ月にわたり体重を測定しその推移を示した。それぞれ 4 匹ずつ測定を行った。エラーバーは標準偏差を示す。



**Fig.17 3M3 及び WT の各組織 HE 染色**

変異型 DT の発現が認められた組織のうち肺 (Lung)、肝臓 (Liver)、心臓 (Heart)、腎臓 (Kidney) の HE 染色を示す。スケールバーは Lung; 200 $\mu$ m、Liver, Kidney; 100  $\mu$ m、Heart; 25 $\mu$ m を、それぞれ示す。

### 1-3-5 変異型 DT-Tg マウスは DT に対して免疫寛容を獲得している

一般的に、異種タンパクを発現している Tg マウスはそのタンパクに対して免疫寛容になっていることが知られている。そのため、完全長の変異型 DT (K51E/E148K) 発現マウスも DT に対して免疫寛容を示すと考えられる。そこで、3M3 に DT を免疫し、その後の免疫応答について解析を行った。Complete Freund's アジュバントとともに 50 $\mu$ g/kg の DT を皮内注射した。2週間後に新たに 50 $\mu$ g/kg の DT のみを単回投与し、6 時間後に血清を回収した。投与した DT が抗体により中和されていれば、血中の残存 DT 活性は検出できないはずである。そこで、DT 感受性 Vero 細胞に回収した血清を添加しタンパク質合成量を測定することで血中残存 DT 活性を見積もった。

Tg-に DT を免疫した場合の血清では、タンパク質の合成阻害が認められず最後に投与した DT の活性が消失している。これに対して、DT を免疫した 3M3 の血清を用いた場合には、タンパク質合成が著しく阻害されたことから血中に残存 DT 活性を検出した (Fig.18A)。これは、3M3 では免疫をしても DT に対する抗体ができなかったために、最後に投与した DT が中和されず血中にその活性を検出することができたのではないかと考えた。そこで、実際に 3M3 が DT 抗体を産生しないことを確かめるために、免疫を行ったマウスの血清を 1 次抗体として精製 DT を検出する Western 解析を行った。Tg-の免疫後の血清では、3 匹とも精製 DT を検出することが可能であった。これに対して、3M3 の場合は免疫後の血清を用いても精製 DT を検出することが出来なかった (Fig.18B)。以上の結果より、3M3 は DT に対する抗体を産生しない、つまり DT 免疫寛容を獲得していることが明らかになった。その後、さらにマイクロインジェクションを行い得られた Tg マウス 23 ラインについてアジュバントを用いた DT の免疫を行ったところ 10 ラインで免疫寛容を獲得していることが明らかになった (Data not shown)。それぞれのラインについて DT の発現量を調べるために Western 解析を行った結果、Western 解析では発現を検出できないラインについても免疫寛容を獲得していたため、DT の発現量は免疫寛容獲得に影響がないことが明らかになった (Data not shown)。



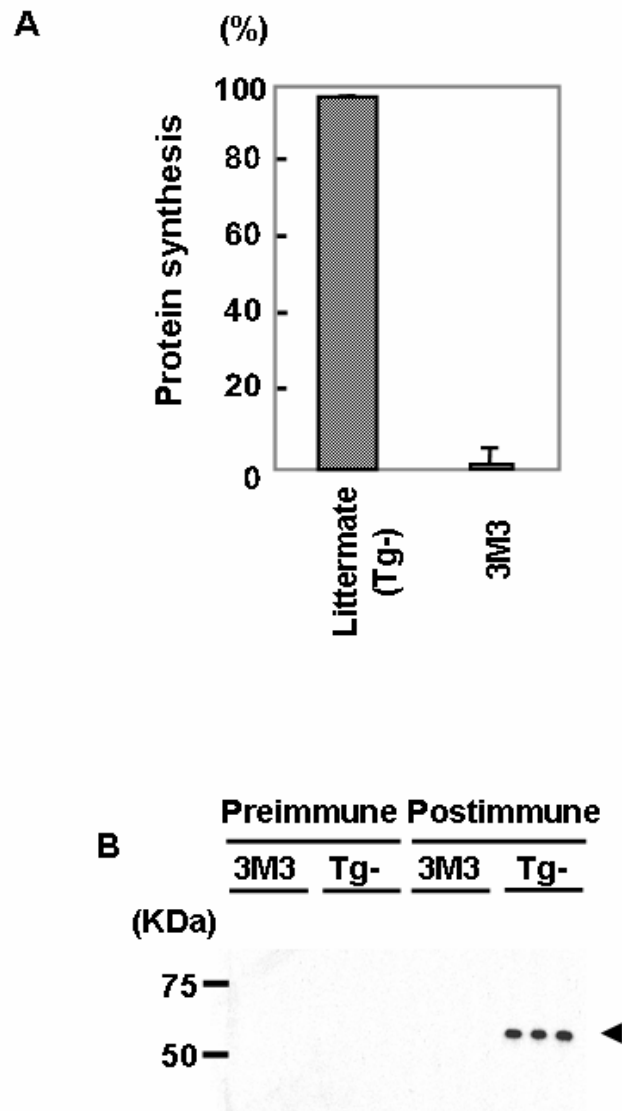


Fig.18 変異型 DT-Tg マウスの DT 免疫寛容解析

A. 変異型 DT 発現マウスにアジュバントを用いて 3M3 と Tg-それぞれ 3 匹ずつ 50 $\mu$ g/kg の DT を免疫した。2 週間後に、DT のみを投与し 6 時間後の血中残存 DT 活性を測定した。投与した DT が抗体により中和された場合には、DT 活性が消失しタンパク質合成阻害は起こらない。エラーバーは標準偏差を示す。

B. 免疫前と免疫後の血清を 1 次抗体として用いた精製 DT の Western 解析 (n = 3)。

#### 1-4. 考察

本研究において、TRECK 法の更なる応用を目指し DT 免疫寛容の作製を試み成功した。また、その過程で K51E/E148K がサイトゾル内で発現させても毒性を示さない変異型であることが明らかになった。作製した DT 免疫寛容マウスは、TRECK 法の応用を考えた場合に非常に有用なマウスである。現在、TRECK 法は血球系や脳などで応用が試みられている (Jung S. *et al.*, 2002, Buch T. *et al.*, 2005)。当然のことながら、それぞれの標的細胞を除去するためには DT を投与する必要があるが DT が届きにくい組織や再生可能な組織で長期間の解析を行う場合には、さらに複数回の DT 投与が必要になると考えられる。マウスの系統に関わらず 5 $\mu$ g/kg 以上の濃度で DT を連続投与した場合には、中和抗体を産生する可能性が非常に高い (Fig2, 3)。そこで、TRECK マウスと今回作製した DT 免疫寛容マウスとを交配して得られる double Tg マウスを用いれば、DT 抗体を産生しないため複数回の DT 投与により長期的な障害を与えることが可能になる。さらに、サイトゾル内で変異型 DT を発現させたことも重要である。作製する double Tg マウスに DT を投与した場合に、サイトゾル内で変異型 DT を発現していれば、投与した DT と体内でトランスジーンより発現する変異型 DT が DTR を取り合い、競合阻害を起こす可能性が極めて低い。そのため、DT 投与依存的な効率の良い組織破壊が可能になる。これによって、今後さらに幅広い組織での TRECK 法の応用が可能になると期待している。

また、現在ジフテリアのワクチン接種により感染症の危険性が軽減し、ジフテリアに関する研究はその幅広い応用へと広がっている。例えば、DT の触媒ドメインをもつ DAB389 を様々なリガンドとの融合タンパクとして精製し標的の組織を破壊する試みや (Frankel AE. *et al.*, 2003, Koshikawa N. *et al.*, 2005)、CRM197 をキャリアタンパクとして使用した多糖体に対する抗体作製 (Porro M. *et al.*, 1980, Anderson P. 1983, Rappuoli R. 1983, Askelof P. *et al.*, 1990, Rothstein EP. *et al.*, 1991, Peters VB. *et al.*, 1996) などが挙げられる。このような研究の中で最も注目を集めているのは CRM197 の抗腫瘍活性である。ある種の腫瘍においては、増殖因子である hHB-EGF の過剰発現が腫瘍形成の原因となっていることが明らかになっている (Yagi H. *et al.*, 2005)。現在、腫瘍で高発現する hHB-EGF について、DT 受容体としての機能に注目した CRM197 を用いた新たな腫瘍治療法の研究が行われており臨床応用も検討されている (Buzzi S. *et al.*, 2004, Miyamoto S. *et al.*, 2004, Miyamoto S. *et al.*, 2006)。この CRM197 の抗腫瘍活性は腫瘍で高発現している hHB-EGF に直接結合することで hHB-EGF の増殖因子としての機能を阻止することにある。そのため、臨

床で変異型 DT を抗腫瘍活性物質として用いる場合には、DTB が hHB-EGF との結合能を有している変異体を使用する。そのため、DTA は細胞内に取り込まれるため、臨床応用には完全にその毒性を消失している必要がある。我々は、これまで毒性がないと考えられていた CRM197 に細胞毒性があることを本研究により初めて明らかにした (Fig.6, 8)。今後、K51E/E148K の hHB-EGF との結合能が CRM197 と同程度であることが示されれば、CRM197 に代わり K51E/E148K を用いた方がより副作用のない治療が行えると期待される。今回、サイトゾル内で K51E/E148K を発現する Tg マウスの作製に成功したことは、K51E/E148K の細胞毒性が極めて低いことを改めて示している。

さらに EF-2 変異株 KEE1 (G717R) のサイトゾル内で WT の DTA を発現させると、CHO-K1 では完全に阻害されていたタンパク質合成を検出できるようになるが、コントロールと比較するとまだ強い細胞毒性を示すことが明らかになった。つまり、G717R 変異 EF-2 では、まだ DT による ADP リボシル化を受けることが示唆された (Fig.9A, B)。これは、培養上清に DT を添加しタンパク質合成量を検出するこれまでの方法では認められなかったことであり (Kohno K. *et al.*, 1985)、本研究により初めて明らかになったことである。同様の結果は、酵母 SE2-GR (G701R) でも認められた。H699M 変異を持つ MKK-M においては KEE1 (G717R) で認められた WT による生育阻害が認められない (Fig.9C)。また、MKK-M (H699M) の Lysate を用いた Western 解析においても CRM197 の発現を確認することができたことから (Fig.10B)、699 番目の His が DT による EF-2 の ADP リボシル化に最も重要であることが明らかになった。しかしながら、MKK-M の Lysate 中の WT の DTA 発現量は CRM197 や K51E/E148K と比較すると低いことが示されており、EF-2 の H699M 変異でも WT の DT に対して完全に耐性であるとは言い切れない。ジフタマイド形成に必須な His 残基が存在しない MKK-M (H699M) を用いることで、おそらく DT による EF-2 の ADP リボシル化は完全に回避されていると考えられる。それでも、MKK-M (H699M) で WT の DTA に若干細胞毒性が残っていることから、DT がリボシル化するターゲットが EF-2 の他に存在する可能性が考えられる。しかし、EF-2 の H699M 変異により WT の DTA の発現を Western 解析で検出可能なほどタンパク質合成が回復していることから、EF-2 以外の分子がリボシル化を受けることによる細胞へのダメージは、EF-2 が不活性化されるほど重大ではないと考えられる。

また、リコンビナント DTA を用いたリボシル化アッセイにより CRM197 には EF-2 の ADP リボシル化活性が認められたが、細胞毒性が認められなかった K51E/E148K でも同様にリボシル化活性が検出されたことは驚くべきことである (Fig.13)。しかし、反応液中の分子数を考えると少量の CRM197 と大量の

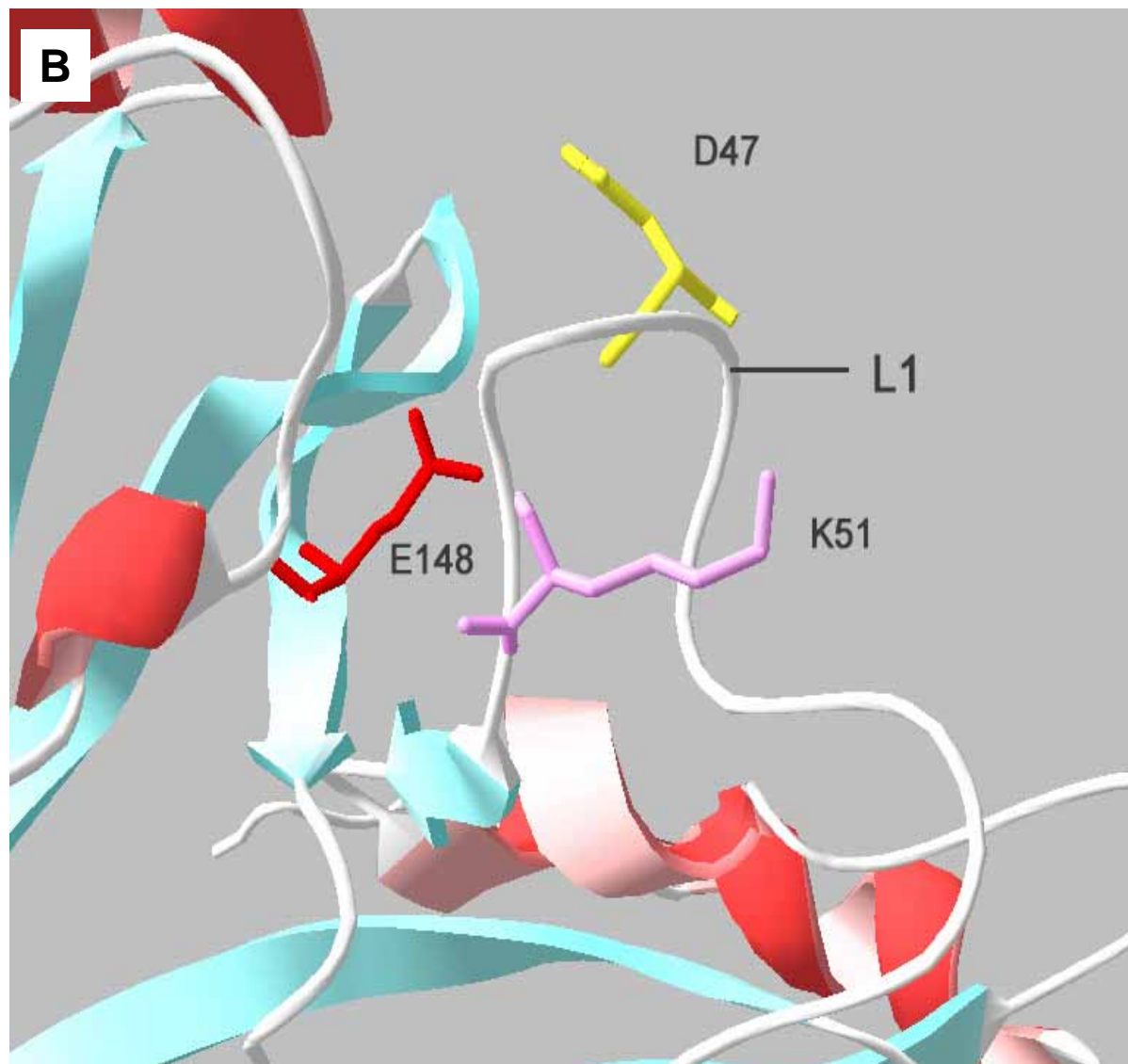
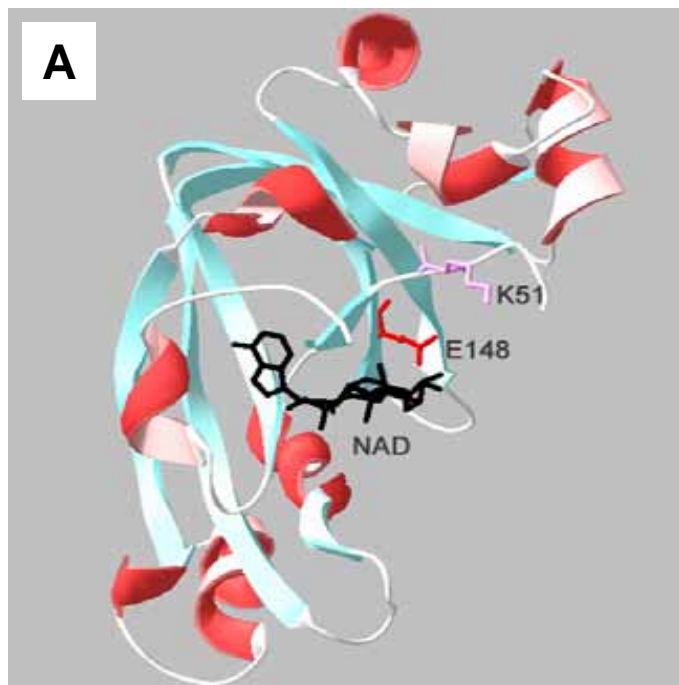
K51E/E148K が同程度のリボシル化活性を示したことから細胞毒性の主たる原因が EF-2 のリボシル化であることは間違いないと考えられる。これは、EF-2 の構造変異を持つ KEE1(G717R)において、CRM197 によるタンパク質合成阻害が認められなかったことから裏付けられているが、用いたリコンビナント GST-CRM197 が他のリコンビナントタンパクと比較して精製度が極めて低くリボシル化活性と細胞毒性との相関について言及するには至らなかった。その後、ジフテリア菌培養上清より精製した DT を用いて、CRM197 が野生型 DT と比較して、 $1 \times 10^6$  倍 ADP リボシル化活性が低いと報告されている (Kageyama T. *et al.*, 2007)。

また、興味深いことに CHO-K1 由来 KEE1(G717R)では Western 解析により CRM197 の発現が確認できたが、同様の変異を持つ酵母 SE2-GR(G701R)ではその発現は確認できなかった (Fig.10B)。この原因は明らかではないが、生物種により DT によるリボシル化感受性に若干差があることが示された。

DT の活性中心解析及び変異型 DT の応用については、これまでに DT 活性に E148 が重要であることが示されている (Tweten RK. *et al.*, 1985)。このアミノ酸は ADP リボシル化酵素のなかで唯一保存されているアミノ酸であるため (Bazan JF. *et al.*, 1997)、リボシル化活性の中心的な役割を担うと考えられている。さらに DT の構造解析により (Yates SP. *et al.*, 2006)、K51、G52 は A フラグメント内のループ (L1) に隣接するように存在しており、特に K51 は L1 直後のヘリックスに存在する D47 と塩橋を形成していると考えられる。そのために K51E によりこの塩橋形成が崩壊し L1 の配置が変化することで NAD との結合が阻害される可能性が考えられる。これに対して G52E(CRM197)では L1 に与える影響が K51E よりも少ないため野生型程ではないが、若干の NAD 結合活性が残っている可能性がある。以上の理由より K51E/E148K は CRM197 よりも細胞毒性が低いと構造学的に推測することができ、本研究においてその実証が得られたと考えている。

このような毒素活性を消失した変異型毒素の研究はワクチンの開発においても非常に重要である。例えば、DTと同じADPリボシル化毒素である百日咳毒素について、変異を導入し毒素活性を消失した毒素 (Glu129、Arg9)が新しいワクチンとしての認可を受けており、さらに興味深いことに変異型毒素がトキシイドよりも免疫原性が高いことが報告されている (Rappuoli R. *et al.*, 1995)。また、毒素活性を消失した変異型毒素は、サイトゾルでの翻訳が必要であるDNA・RNAワクチンとしての応用も可能になる。そのため、K51E/E148K変異型DTがCRM197に代わり抗腫瘍治療やワクチンなどの臨床分野において、今後さらに幅広く応用されることが期待される。

細胞のコンディショナルノックアウト法は、個体で特定の細胞や組織について、その生理機能を解析するには非常に有効である。TRECK 法以外にもカスパーゼ 3 の活性化によるアポトーシスの利用 (Mallet VO. *et al.*, 2002) やインフルエンザウィルスの変異型イオンチャンネルを利用したプロトン輸送異常による細胞死の利用 (Smith CA. *et al.*, 2002) など様々な方法が開発されている。その中でも、TRECK 法は毒素の受容体を発現させる点で他の方法とは大きく異なっており発症の時期や、障害の程度を DT 投与量によって任意にコントロールすることが可能であるため非常に有効な方法であると言える。TRECK 法で用いる DT は、マウスにとって異種タンパクである。そのため、長期的な解析を目的とした場合に複数回投与を行うと、マウス体内で中和抗体を産生し DT 投与による効率の良い細胞破壊ができなくなる恐れがあったが、K51E/E148K 変異型 DT を用いて、DT に対する免疫寛容を獲得したマウスの作製に成功したことから中和抗体による TRECK 法への影響を回避することができた。また、TRECK 法のもう 1 つの課題であった DT 受容体の持つ EGF 活性やプロテアーゼによる切断などの点についても改良が進んでおり、増殖因子活性を消失し、プロテアーゼによる切断を受けにくい hHB-EGF の作製に成功している (Furukawa N. *et al.*, 2006)。そのため、これまでに TRECK 法の抱えていた課題を克服することができたと考えている。そこで、今後は TRECK 法を用いて、これまで困難だったヒト疾患の原因解明やその治療法の開発に貢献できることを期待している。



参考3) DTの構造

(A)は、DTAの3次元構造を(PDB 1DTP)、(B)は、変異導入アミノ酸部分の拡大したものを示す(PDB 1MDT)。K51はL1直後のヘリックス上に存在するD47と塩橋を形成していると考えられる。

第 2 章  
骨粗鬆症モデルマウスの作製

## 2-1.序論

高齢化社会が進む現在、骨粗鬆症研究は非常に重要である。なぜなら、その患者数は年々増加しており大腿骨頸部を骨折した場合には、その多くが寝たきりになってしまう。そのため、高齢者の QOL: Quality of life が低下するだけでなく、医療費の負担は社会的にも非常に深刻な問題となっている。それにもかかわらず、骨粗鬆症の治療は予防策程度に留まっており、効果的な治療法がまだ見出せていないのが現状である。その原因のひとつとして、骨粗鬆症モデル疾患動物の作製が困難であることが挙げられる。現在、利用されている骨粗鬆症モデル動物としては 卵巣除去による骨粗鬆症の誘導、加齢による骨粗鬆症病態再現、動物を固定し不動化することによる骨粗鬆症の誘発などがあるが、実際にはそれぞれ煩雑な手間と時間を要する。例えば、卵巣除去の場合は手術を施す必要がある上、病態再現までには時間がかかるが、必ずしも全ての個体が骨粗鬆症を発症するわけではない。また、加齢に伴う骨粗鬆症の病態の再現は飼育期間が長く、個体差もあるため必要な個体数を確保するには困難である。そのため、より簡便な骨粗鬆症モデルマウスの作製が望まれていた。本研究室で開発したジフテリア毒素 (DT) 受容体を介した新しい細胞ノックアウト法である TRECK (Toxin Receptor-mediated Cell Knockout) 法では、DT を投与するだけで容易に肝炎モデルマウスや (Saito M. *et al.*, 2001)、糖尿病モデルマウスを作製することが可能である。そこで、骨粗鬆症モデルマウスについても TRECK 法を用いることで、より簡便に作製することが可能になるのではないかと考えた。

骨組織は体の保持だけでなく、骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞とのバランスによりシグナル伝達に重要な、体内のカルシウムの代謝に深く関わっている組織でもある。骨芽細胞は未分化間葉系細胞から分化すると考えられている。休止期では骨表面で扁平な繊維芽細胞様の形をしているが、活動期に入ると立方体型に変化し、Ⅰ型コラーゲン・オステオネクチン・オステオカルシンなどの骨基質タンパクや、増殖因子である TGF- $\beta$ ・IGF・FGF・BMP などを分泌し骨基質の石灰化を行う。一方、破骨細胞は単球・マクロファージ系の血液幹細胞由来と考えられており、複数の核を持つ大型の細胞で酸や酵素を効率よく作用させ骨吸収を行う。この骨吸収に関わる骨吸収促進ホルモンは骨芽細胞が分泌するため、破骨細胞は骨芽細胞の近くに存在している。この様に我々の体内では、骨形成を行う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞がお互いのバランスを保ちながら骨代謝を行うことで、常に新しい骨へと作り変える骨のリモデリングが行われている。つまり、この骨リモデリングに異常があると骨



粗鬆症を初めとする様々な疾患が誘発されるのである。

我々は、骨芽細胞特異的に障害を与えることで骨形成を阻害し、破骨細胞による骨吸収のみが起こるような状態を再現できれば骨粗鬆症を誘発することが可能になるのではないかと考えた。骨芽細胞が分泌するオステオカルシンは、骨基質タンパクの非コラーゲンタンパクの中で最も大量に存在する。そのため、血中のオステオカルシン濃度は骨代謝に連動しており骨疾患における生理学的マーカーとして臨床で広く用いられている。この骨芽細胞特異的なオステオカルシン (Osteocalcin gene 2:OG2) のプロモーターを利用し、私は新しい TRECK 骨粗鬆症モデルマウスの作製に着手した。

骨粗鬆症には女性ホルモンであるエストロゲンが減少することによって起こる閉経後骨粗鬆症、老化に伴い骨芽細胞への分可能や骨基質分泌能が低下する老年性骨粗鬆症、及びグルココルチコイド投与による続発性のステロイド性骨粗鬆症が存在する。TRECK 法を用いた骨粗鬆症マウスは骨芽細胞特異的にアポトーシスを誘導するため、ステロイド性骨粗鬆症に近いモデルマウスが得られると考えられる。ステロイド性骨粗鬆症の原疾患としては、関節リウマチ・膠原病・自己免疫疾患が多く骨粗鬆症推定患者のうち約 20% がステロイド性骨粗鬆症でありグルココルチコイドの長期服用患者の 25% が骨折を経験していると考えられている。ステロイド性骨粗鬆症の発症は投与総量と期間に相関しているため、高齢者や閉経後女性ではステロイド性骨粗鬆症を発症しやすくなる。生理的濃度のグルココルチコイドであれば、骨芽細胞の分化・増殖に必要であるが、過剰量存在するとオステオカルシンの合成などを抑制しアポトーシスを誘導することが知られている。

今回我々が作製を試みる骨粗鬆症モデルマウスは骨芽細胞を標的とし骨形成を阻害することで骨粗鬆症を誘発する。しかし、先程も述べた様に骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化し常に骨形成に関わっている細胞であるため、DT の単回投与により一時的に骨芽細胞を除去しても、あらたに骨芽細胞が分化してくると考えられる。そのため、病態の再現には連続的な DT 投与が必要になると考えられる。これまでに 5 $\mu$ g/kg 以上の濃度で DT を連続投与した場合に、マウスは中和抗体を産生することが明らかになっている(第 1 章参照)。そこで、DT 免疫寛容マウスとの併用も考慮に入れ骨粗鬆症モデルマウスの作製を試みたので報告する。

## 2-2. 材料と方法

本研究においてプラスミド作製には大腸菌のDH5 $\alpha$ を用いた。また各制限酵素はTaKaRa社のものを使用した。オリゴDNA合成は北海道システムサイエンス社による。マウスは全て日本クレア株式会社(CLEA Japan, Inc.)から購入し、使用したDTはジフテリア菌(PW8株)の培養上清より精製したものをを用いた(Ishii-Kanei C. *et al.*, 1979、当研究室岩脇隆夫修士論文)。

### 2-2-1 細胞

マウス骨芽細胞培養株であるMC3T3-E1細胞(本学バイオサイエンス研究科川市正史教授より供与)はMEM(#M4526:SIGMA)を用い37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で培養した。トリプシン処理には0.01%トリプシン/0.05%EDTAを用いた。

### 2-2-2 MC3T3-E1のDT感受性試験

MC3T3-E1へのトランスフェクションはリポフェクションにより行った。24 well dish(#3513:CORNING)で培養した細胞にEffecten(QIAGEN)を用いてレポーター(ルシフェラーゼ発現プラスミドであるpCAG-GL3、当研究室の岩脇隆夫博士が作製):エフェクター(pOG2-DTR)が1:4になる様にマニュアルに従いトランスフェクションを行った。12時間後、培養液中に希釈したDT(終濃度10, 1, 10 $^{-1}$ , 10 $^{-2}$ , 10 $^{-3}$   $\mu$ g/ml)を加えさらに12時間培養した。トランスフェクション24時間後、細胞からタンパク質を回収しサンプルとして使用した。DTのタンパク質合成阻害活性はルシフェラーゼ活性を指標とすることで定量し、活性測定にはLuciferase TM Reporter Assay System (Promega)を用いた。

### 2-2-3 Tg マウス作製

#### トランスジェンの作製

pBstN(福島県立医科大学生体情報伝達研究所、小林和人博士より供与)にEcoRでhuman HB-EGFを導入したpTRECK1(当研究室古川智久修士論文参照)のプロモーター領域にPCRで増幅した骨芽細胞特異的プロモーター(1.3Kb)をNotI/BamHIにより導入したpOG2-DTRを作製した(Fig.18)。オステオカルシンプロモーターはGerard Karsenty博士(Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston)より供与頂いた。塩基配列を確認後このプラスミドから、XhoI/NotIでトランスジェンを切り出し0.8%アガロースゲルからQIA quick

Gel Extraction kit (QIAGEN)を用いて精製した。用いたプライマーは以下に示す。

	98	,5分	
5N-OG2pro: AAG GAA AAA <u>AGC GGC CGC</u>	98	,30秒	} 35サイクル
ATC TGT AGA ATA GTC CAT CC	58	,30秒	
OG2pro-3B: CGC <u>GGA TCC</u> GAC TTG TCT GTT	72	,90秒	
CTG CAC CCT	72	,7分	
	4	,	

二重下線は *Not* を、下線は *Bam* H を示す。

### 受精卵の採取

採卵予定日 3 日前に、5 週齢の C57BL/6J 雌マウスに牝馬血清性腺刺激ホルモン (Pregnant mare serum gonadotrophin、PMSG: 帝国臓器) を 5IU/匹腹腔内投与した。採卵予定日の 20 時間前にヒト絨毛性生殖刺激ホルモン (human chorionic gonadotrophin、hCG: 三井ゾーキ) を 5IU/匹腹腔内投与し、雄マウス C57BL/6J と同ケージにて飼育交配させた。翌朝雌マウスの卵管を切除し実体顕微鏡下にて受精卵を膨大部より採取して 1mg/ml のヒアルロニダーゼ (SIGMA) 培養液中で卵丘細胞を除去した後、受精卵を M2 培地中 (SIGMA) で洗浄した。さらにパラフィンオイルで覆われた M16 培養液 (SIGMA) 液滴中でインジェクションまで 37、5%CO<sub>2</sub> で培養した。

### マイクロインジェクションと移植

1ng/μl に 10mM Tris/ 0.1mM EDTA (pH7.4) で希釈した DNA を受精卵の雄性前核中にインジェクションした。この卵を一晩 37、5%CO<sub>2</sub> 中で培養後、2cell を偽妊娠マウス Jcl:ICR の卵管に移植した。

#### 2-2-4 マウス尾からのゲノム回収

3~4 週齢になるマウスを親から離乳後、尾を約 1cm 切除した。1ml の Lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1mM NaCl、20mM EDTA、1% SDS) に Proteinase K を 100μg/ml になるように添加し 55 で 4 時間から 1 日かけて完全に溶解した。その後フェノール・クロロホルム抽出を 2 回繰り返し、エタノール沈殿後 70%エタノールで洗浄し適量の TE に一晩かけて溶解した。

#### 2-2-5 Southern 解析

マウスゲノム 5μg を *Eco* R で完全消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動し

た。EtBrで染色しサテライトバンドによりゲノムの完全消化を確認した後、0.25M HClで加水分解処理し続いて1.5M NaOH、0.5M NaClで中和した。その後、0.4M NaOHでポジティブチャージのナイロンメンブラン (Hybond N+ : Amersham Bioscience) にアルカリトランスファーを行い、2×SSC (0.3M NaCl、0.03M Na Citrate-2H<sub>2</sub>O (pH7.0)) でメンブランを洗浄した。メンブランへのDNAの固定は80℃で2時間 Baking 処理することにより行なった。

### プローブの調整

プローブはpOG2-DTR (Fig.18) より *Eco* R で切り出し、フラグメントを0.8%アガロースゲルから回収して使用した。プローブはRandom Primer DNA labeling kit ver.2 (TaKaRa) を用いて [<sup>32</sup>P]dCTPで標識した。解析にはBAS 2500 system (FUJIFILM) を使用した。

### ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション、メンブランの洗浄にはチャーチリン酸 buffer (0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、pH7.2) (Church G. 1984) を使用した。メンブラン100cm<sup>2</sup>あたり5mlのハイブリダイゼーションbuffer (1M チャーチリン酸 buffer、1mM EDTA、7% SDS) で65℃、5分間以上プレハイブリダイゼーションを行った。その後、プローブを添加し65℃で16~20時間ハイブリダイゼーションした。洗浄液 (40mM チャーチリン酸 buffer、1% SDS) で65℃、5分間洗浄を3回繰り返し最後に15分間洗浄した。シグナルの検出はBAS 2500 system (FUJIFILM) を用いて行った。

### 2-2-6 Genomic PCR

マウス尾から回収したゲノムをテンプレートに、*rTaq*® DNA polymerase (TaKaRa) を用いて PCR を行った。以下にプライマーの配列を示す。

	98℃	,5分	
hHE-F1: GCT CTT TCT GGC TGC AGT TC	98℃	,30秒	} 35サイクル
hHE-R3: TTT TTG ATA GGG CCA TGC TC	58℃	,30秒	
	72℃	,30秒	
	72℃	,7分	
	4℃	,	

### 2-2-7 血中 DT 活性の検出

24 well plastic dish (#3526: CORNING) に5.0×10<sup>4</sup> cells/wellになるようDT感受性 Vero細胞を培養し、その培養液中 (500μl) に希釈した血清を100倍希

釈になるようにそれぞれ5 $\mu$ lずつ加え6時間培養した。その後200 $\mu$ lのメチオニン、システイン不含培地に交換し<sup>35</sup>Sラベル化メチオニン、システイン溶液(5 $\mu$ Ci/ml、NEG-772:NEN)を加え1時間培養した。さらにPBS(-)で洗浄し、細胞を0.1N NaOHで溶解し10%トリクロロ酢酸を加えた。生成した沈殿物を10穴吸引式 glass filterフォルダーを用いて25mm glass filter(#1822-025:Whatman)に吸着させ、その放射活性を液体シンチレーションカウンター(BECKMAN)で測定した。

### 2-2-8 培養細胞からのタンパク質回収

トリプシン処理で細胞を回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1% NP-40、1mM EDTA、2 $\mu$ g/mlアプロチニン(#03346-84:nacalai tesque)、2 $\mu$ g/mlロイペプチン(#L-2884:SIGMA)、1 $\mu$ g/mlペプスタチン(#4397:ペプチド研究所)、100 $\mu$ g/ml PMSF(#273-27:nacalai tesque)を含むPBS(-)に懸濁し氷上で20分間静置した。その後、遠心し(15,000rpm、4、2分)上清を回収した。

### 2-2-9 RT-PCR

#### マウス組織からの RNA 回収方法

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、それぞれの臓器を摘出した。次に、ISOGEN(NIPPON GENE)1mlとガラスビーズを加え MIXER MILL MM300(QIAGEN)で30回/秒、3分間組織破壊を行った。以下、マニュアルに従いRNA抽出を行った。

#### PCR 反応

Total RNA 20 $\mu$ gを37で30分間DNase(0.5U)処理しフェノール・クロロホルム抽出した。エタノール沈殿後、70%エタノールで洗浄し適量のDEPC水に溶解し SuperScript II (Invitrogen)を用いて逆転写反応を42で50分間行った。反応液をRNase Hで処理したものをcDNAとして使用した。コントロールには、mouse GAPDHを使用した。使用したプライマーは以下に示す。

#### Osteocalcin

OC-F: ATG AGG ACC CTC TCT CTG CT

OC-R: CTA AATAGT GAT ACC GTA GA

98	,5分	} 35サイクル
98	,30秒	
58	,30秒	
72	,30秒	
72	,7分	
4	,	

### hHB-EGF

hHE-F1: GCT CTT TCT GGC TGC AGT TC

hHE-R3: TTT TTG ATA GGG CCA TGC TC

### mouse GAPDH

mGAPDH 1sense: GCC GAA TTC ATG GTG AAG GTC GGT GTG A

mGAPDH 1042anti: GCC GAA TTA TTG CTC AGT GTC CTT GCT GG

## 2-2-10 骨組織パラフィン切片の作製方法

### 組織の固定

10%ホルマリンで一晩、4℃で固定した。

### 脱灰

\* EDTA 脱灰

サンプルを脱灰液 (0.24M EDTA · 2Na · 2H<sub>2</sub>O) に浸し 2、3 日に一度交換しながら 2 ~ 3 週間、4℃でゆっくり攪拌しながら脱灰を行った。

\* 酸脱灰

10%ギ酸クエン酸ナトリウム脱灰液 (29g クエン酸、18g クエン酸三ナトリウム水和物、100ml 蟻酸/1l) を加え 4℃で一晩ゆっくり攪拌しながら行った。

### 脱水・脱脂

メタノール 70%、80%、90%、100%の順に、サンプルをそれぞれ 4℃で 6 時間処理した。さらに、100%メタノールを 6 時間ごとに 2 回交換した。その後、クロロホルムに浸し 2 時間毎に 3 回交換し、最後に新しいクロロホルムに交換しサンプルを一晩浸した。

### パラフィン浸透・包埋

70℃パラフィンに 2 時間ずつ 4 回浸し、新しい 70℃パラフィンで一晩浸透処理を行った。翌日、新鮮なパラフィンでサンプルを包埋した。

### 薄切

マイクロームを用いて 6 ~ 8 μm に薄切した切片を APS コートしたスライドガラス (SUPER FROST MICRO SLIDE GLASS: MATSUNAMI) に水を落としその上にとる。その後、伸展機で一晩乾かした。

## 脱パラフィン処理

ドラフト内で Hemo-De ( # CS-1001 : 藤沢薬品工業株式会社 ) に 5 分ずつ、3 回浸した。その後、100% エタノール、90% エタノール、80% エタノール、70% エタノール、ddH<sub>2</sub>O の順に 1 分ずつ浸したスライドガラスを HE 染色や免疫染色に使用した。

## 2-2-11 骨組織凍結切片作製

マウス組織をホルマリン固定後脱灰し、30% sucrose に置換し 4 で一晩ゆっくり攪拌した。O.C.T.Compound ( #4583 : SAKURA ) 中で凍結後、クライオスタットにて 8 ~ 10 $\mu$ m の切片を作製した。切片を PBS (-) で処理し O.C.T.Compound を除去してから免疫染色や HE 染色に使用した。

## 2-2-12 HE 染色

ヘマトキシリン ( #131-09665 : Wako ) で 5 分染色後、流水で 10 分から一晩かけて水洗後、ddH<sub>2</sub>O に浸す。70%、85%、92.5%、96%、100% それぞれの濃度のエタノール順に 5 分ずつ浸した。エオジン ( #050-06041 : Wako ) で 1 分染色後、適度な濃さになるまで 70% エタノールで洗浄した。100% エタノールで 3 回洗浄後、さらに 100% エタノールに 5 分  $\times$  3 回\*浸した。Hemo-De に 5 分  $\times$  2 回 ( # CS-1001 : 藤沢薬品工業株式会社 ) 浸した後、マウントクイック ( 大道産業株式会社 ) を用いて封入し、顕微鏡 ( COOL SCOPE : Nikon ) にて観察を行った。

\*) 無水エタノールを作製するために Molecular sieves 3A 1/8 ( #133-08645 : Wako ) を添加した。

## 2-2-13 免疫染色

### 凍結切片

内在性ペルオキシダーゼを賦活化させるため、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS で室温、30 分処理し PBS ( ) で 5 分、2 回洗浄した。次に PBS/0.2% Triton X-100/5% normal horse serum ( PBST/NHS ) で 30 分間 blocking をした。なお、オステオカルシンを検出する場合には normal donkey serum を使用した。PBS (-) で 5 分、2 回洗浄後内在性のビオチンを blocking するためアビジン ( Vector ) を 15 分間処理し PBS (-) で 2 回洗浄した。その後、内在性のアビジン様分子を blocking するためにビオチン ( Vector ) を 15 分処理し PBS (-) で 5 分、2 回洗浄した。1 次抗体は hHB-EGF の検出には Goat anti-human HB-EGF ( # AF-259-NA : R&D SYSTEMS 100 倍希釈 ) を、マウス Osteocalcin の検出には Rabbit anti-mouse

Osteocalcin (#M173:TaKaRa 2,500 倍希釈)を使用し、4 で一晩処理した。翌日、PBST/NHS で 5 分、2 回洗浄後ビオチンラベルした 2 次抗体 (Jackson) を PBST/NHS で 300 倍希釈して1時間処理した PBST/NHS で 5 分洗浄し続いて、PBS(-)で 5 分、2 回洗浄した。予め A 液 : B 液 : PBS(-)を 1 : 1 : 200 で混和し 30 分間静置させた Vector Elite ABC reagent(Vector)を 30 分間処理した。そして、PBS(-)で 5 分、3 回洗浄し 10mg DAB/ 60mg Ni ammonium sulfate/ 10ml 50mM Tris-Cl(pH7.6)に 2 $\mu$ l の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えたものをフィルターで濾過後 5 分処理した。PBS(-)で 5 分、2 回洗浄し一晩乾燥させた。翌日脱水後、マウントクイックを用いて封入した。

### パラフィン切片

脱パラフィン処理後、内在性ペルオキシダーゼを賦活化させるため、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100%メタノールに室温で 30 分処理し PBS(-)で 5 分、3 回洗浄した。次に、15  $\mu$ l 血清/1 ml PBS(-)で 30 分 blocking した(HB-EGF; normal horse serum, Osteocalcin; normal donkey serum)。PBS(-)で 5 分、2 回洗浄後、内在性のビオチンを blocking するためアビジン(Vector)を 15 分間処理し PBS(-)で 2 回洗浄した。その後、内在性のアビジン様分子を blocking するためにビオチン(Vector)を 15 分処理し PBS(-)で 5 分、2 回洗浄した。1 次抗体は hHB-EGF の検出には Goat anti-human HB-EGF ( AF-259-NA : R&D SYSTEMS、100 倍希釈)を、マウス Osteocalcin の検出には Rabbit anti-mouse Osteocalcin (#M173: TaKaRa 2,500 倍希釈)を使用し、1%BSA/PBS(-)で希釈し 4 で一晩反応させた。翌日、PBS(-)で 5 分、3 回洗浄後 2 次抗体 (1ml PBS(-), 500  $\mu$ l 1 %BSA/PBS(-)、12.5  $\mu$ l 血清、5  $\mu$ l ビオチンラベル 2 次抗体:Jackson)を室温で 30 分反応させた。PBS(-)で 5 分、3 回洗浄後、予め A 液 : B 液 : PBS(-)を 1 : 1 : 200 で混和し 30 分間静置させた Vector Elite ABC reagent(Vector)を 30 分間処理した。PBS(-)で 5 分、3 回洗浄後に DAB 発色\*を行った。PBS(-)で 5 分、2 回洗浄し反応を停止させヘマトキシリンにより対比染色後、脱水処理しマウントクイックを用いて封入し、顕微鏡 (COOL SCOPE:Nikon)にて観察を行った。

#### **\* )DAB 発色**

10×DAB 150 $\mu$ l

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ l

50mM Tris-HCl(pH7.5) 1.3ml

遮光し室温で 30 分間反応させた。

#### 10×DAB

DAB (# 049-22831:Wako) 5mg

50mM Tris-HCl(pH7.5) 1ml を混合

150 $\mu$ l ずつ-30 で保存



## 2-3. 結果

### 2-3-1 マウス骨芽細胞培養株 MC3T3-E1 でhHB-EGF は DT 受容体として機能する

骨芽細胞において、OG2 プロモーターが骨組織特異的に機能しているのかどうか、また hHB-EGF が DT 受容体として機能するのかどうかを解析するためにマウス骨芽細胞由来株 (MC3T3-E1) を用いた。まず、MC3T3-E1 にリポフェクションにより pOG2-DTR (Fig.19)、Mock を導入した。それぞれの細胞から RNA を回収し RT-PCR を行った。ポジティブコントロールとしては、マウス NIH3T3 細胞にインフェクションにより hHB-EGF を導入した細胞を用いた。その結果、MC3T3-E1 細胞において OG2 プロモーター制御下で hHB-EGF を発現していることを確認した (Fig.20A)。次に、骨芽細胞における hHB-EGF の DT 受容体としての機能を確かめるために MC3T3E-1 に pOG2-DTR と、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするレポータープラスミド pCAG-GL3 をリポフェクションにより共発現させた。トランスフェクション 12 時間後に DT を加え、24 時間後に細胞を回収しルシフェラーゼ活性をタンパク質合成量の指標として測定した。DT は細胞内に取り込まれると宿主細胞のタンパク質合成を阻害する。そのため、トランスジーンが機能していれば、DT が細胞内に取り込まれ共発現させているルシフェラーゼの合成が阻害されることが予想される。pOG2-DTR を導入した場合のみ DT 濃度依存的にタンパク質合成量が低下していることが明らかになった (Fig.20B)。以上のことから、骨芽細胞においても hHB-EGF が DT 受容体として機能していることが明らかになった。以上のことから OG2 プロモーター制御下で hEB-EGF を発現させることで骨芽細胞を標的とした TRECK マウスの作製が可能であると判断した。

### 2-3-2 Tg マウスの作製及び発現確認

#### RT-PCR

次に、トランスジーン (Fig.21) を用いて Tg マウスを作製した。マウス尾からゲノムを回収し Genomic PCR と Southern 解析を行ったところ、トランスジーンの導入が確認できる 14 ラインの Tg マウスを取得することができた。得られた Tg マウスの骨組織から RNA を回収し、RT-PCR を行ったところ、Tg3 について、オステオカルシンの発現している骨組織 (大腿骨及び歯) のみ hHB-EGF の発現を確認することができ、他の組織での発現はまったく認め

られなかった (Fig.22A)。また同様の結果を Tg5 でも得ることができた (Data not shown)。

### 免疫染色

次に、骨芽細胞特異的に hHB-EGF を発現しているかどうかを確認するため、Tg3 より大腿骨を摘出し EDTA 脱灰後パラフィン切片を作製した。骨芽細胞特異的マーカーであるオステオカルシンと DT 受容体である hHB-EGF について、それぞれ免疫染色を行った。その結果、オステオカルシンと同様に hHB-EGF の発現を骨芽細胞で確認することができたことから Tg3 では骨芽細胞特異的に hHB-EGF が発現していることが明らかになった (Fig.22B)。また、Tg5 においても同様の結果が得られた (Data not shown)。

### 2-3-3 50 $\mu$ g/kg の DT 連続投与

これまでに、骨細胞を標的とした TRECK マウスにおいて、500 $\mu$ g/kg の DT を関節に直接投与して初めて DT 投与依存的な骨細胞死を確認することができたという報告があったため (Personal communication)、骨を標的とした TRECK 法では高濃度の DT 投与が必要であると考えられた。さらに、骨粗鬆症を誘発するためには長期的に骨芽細胞にダメージを与える必要があり DT の連続投与を行わなければならない。マウスにおける DT の LD<sub>50</sub> (median lethal dose) は 500 $\mu$ g/kg であり (Pappenheimer AM Jr. *et al.*, 1982) 500 $\mu$ g/kg 投与では WT でもマウスが死亡してしまい長期的な解析が困難であるため、50 $\mu$ g/kg を DT 投与濃度として設定した。また、50 $\mu$ g/kg の DT はマウスに投与すると約 3 日で代謝されることが明らかになっている (当研究室 岩脇隆夫修士論文参照)。そのため、連続的に骨芽細胞に障害を与える目的で、血中に常に DT が存在するよう Tg3 及びその同腹子 (Tg-) 3 匹ずつに 50 $\mu$ g/kg の DT を 3 日毎に腹腔内投与した。

その結果、Tg3 と Tg-どちらも 6 日目以降体重が減少し始め、10 日後に Tg3 で 2 匹、Tg-でも 2 匹が死亡した (Fig.23)。このとき、DT 投与による骨芽細胞の減少しているのかどうかを調べるために、DT 投与開始 10 日後に生存していた個体について、大腿骨を回収し酸脱灰処理後、海綿骨部分の凍結切片を作製した。骨芽細胞は、エオジンで染色されるため HE 染色を行った。その結果、DT を投与した Tg3 と Tg-のいずれにおいても骨芽細胞の減少は確認できなかった (Fig.23)。

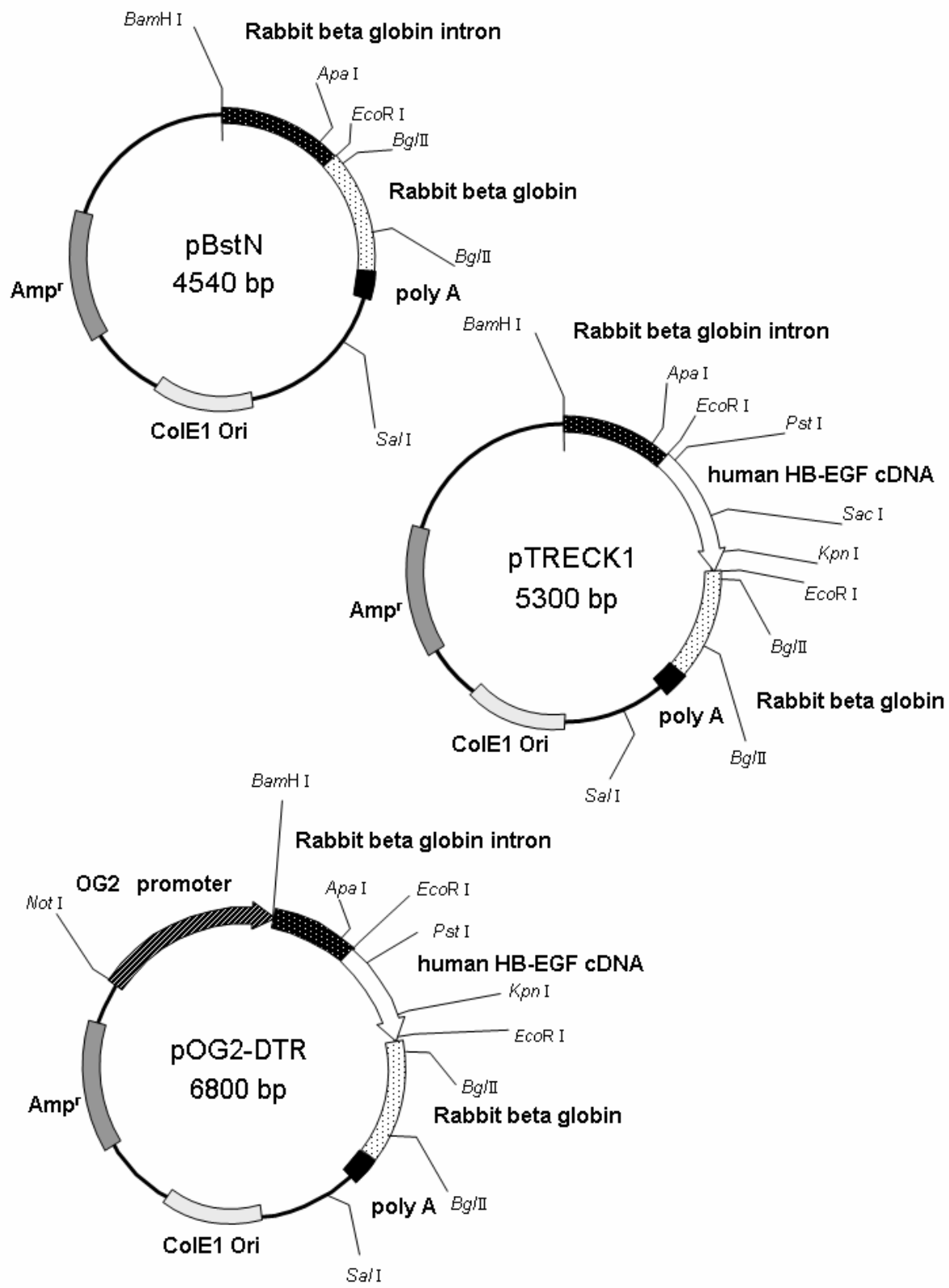
#### 2-3-4 10 $\mu$ g/kg DT の 1 週間及び 2 週間連続投与

50 $\mu$ g/kg の連続投与を行った場合に死亡する個体が存在したため、投与する DT 濃度を 10 $\mu$ g/kg へ変更し連続投与を行った。3 日毎に 10 $\mu$ g/kg の DT を Tg3 マウス腹腔内に連続投与を行った。DT 投与 1 週間(2 回投与)及び、2 週間(4 回投与)のマウスの組織を回収し、EDTA 脱灰後凍結切片を作製しオステオカルシンによる免疫染色を行った。その結果、10 $\mu$ g/kg の DT を 1 週間あるいは 2 週間投与したいずれの場合においても、DT による骨芽細胞の消失は確認できなかった(Fig.24)。

#### 2-3-5 10 $\mu$ g/kg DT の 1 ヶ月連続投与

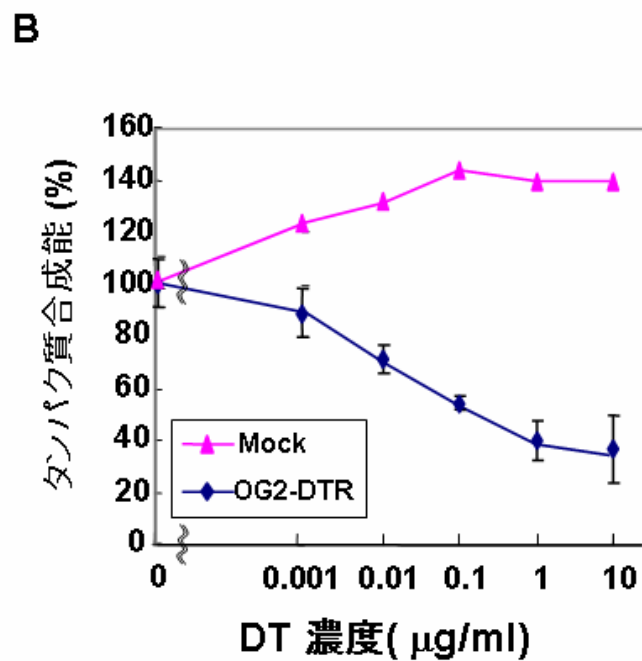
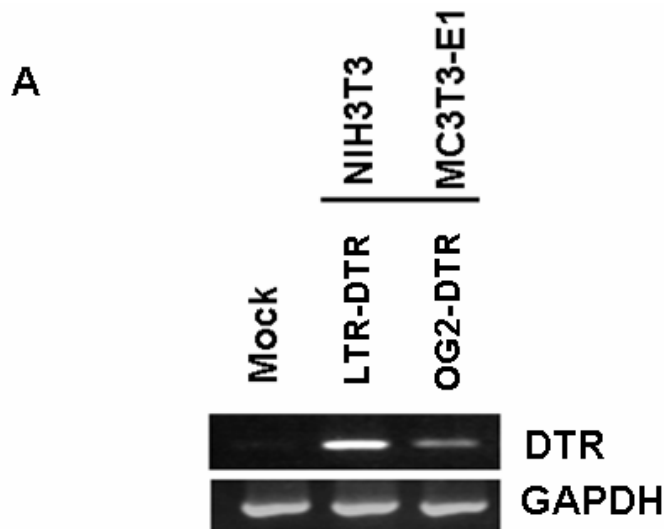
そこで、10 $\mu$ g/kg の DT 投与期間を 1 ヶ月まで延長した。10 $\mu$ g/kg の DT 投与であれば死亡する個体なかった(Fig.25A)。しかしながら、1 ヶ月経過しても一般的な骨粗鬆症モデルマウスで見られるような明らかな骨格の異常は認められなかった(Data not shown)。実際に DT 投与により骨芽細胞が減少しているのかどうかを確認するために、DT を 1 ヶ月間連続投与(10 回投与)したマウスの大腿骨を酸脱灰し、凍結切片を作製し骨芽細胞特異的に発現するオステオカルシンの免疫染色を行った。Tg3 で大腿骨の海面骨部分において通常骨表面に存在している骨芽細胞が確認できず、骨基質の一部のみが染色されていることが観察された(Fig.25B)。

そこで、次に DT を 1 月間連続投与(10 回投与)した先程のマウスが DT に対する中和抗体を産生しているかどうかを調べた。DT はタンパク質合成を阻害することにより細胞毒性を示す。そこで、DT を 1 月間連続投与したマウスに、さらに 50 $\mu$ g/kg の DT を単回投与し 6 時間後に血清を回収した。その血清を DT 感受性 Vero 細胞の培養液に添加し、タンパク質合成量を測定することで血中残存 DT 活性を解析した。血中に DT 活性が残っていればタンパク質合成が著しく阻害されると考えられる。コントロールの PBS を連続投与したマウスでは、タンパク質合成が著しく阻害を受けていることから血中に残存 DT 活性を検出した。これに対して、10 $\mu$ g/kg の DT を連続投与したマウスで、タンパク質合成がほとんど阻害されず血中に DT 活性が認められない個体の存在が明らかになった。つまり、DT を連続投与したマウスのうち 5 匹中 3 匹で DT の中和抗体を産生していることが示唆された(Fig.26)。



**Fig.19 pOG2-DTR プラスミドマップ**

pOG2-DTR 及び、その作製に使用したプラスミドを示す。



**Fig.20 MC3T3-E1 での OG2-DTR 機能確認**

A. MC3T3-E1 に Mock と pOG2-DTR をトランスフェクションし回収した RNA 及び、ポジティブコントロールとして NIH3T3 に hHB-EGF をインフェクションした細胞から RNA を回収し RT-PCR を行った。

B. MC3T3-E1 にルシフェラーゼと pOG2-DTR を共発現させた。トランスフェクション 12 時間後に DT を添加し、24 時間後にタンパク質合成量をルシフェラーゼの活性を指標に算出した。なお、値は未処理サンプルのタンパク質合成量を 100% とした。

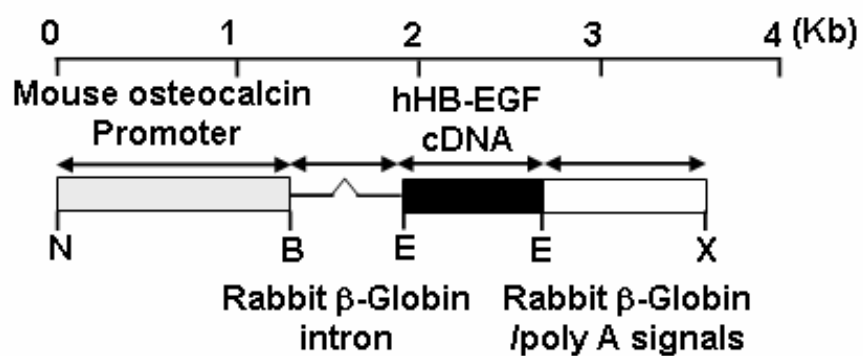
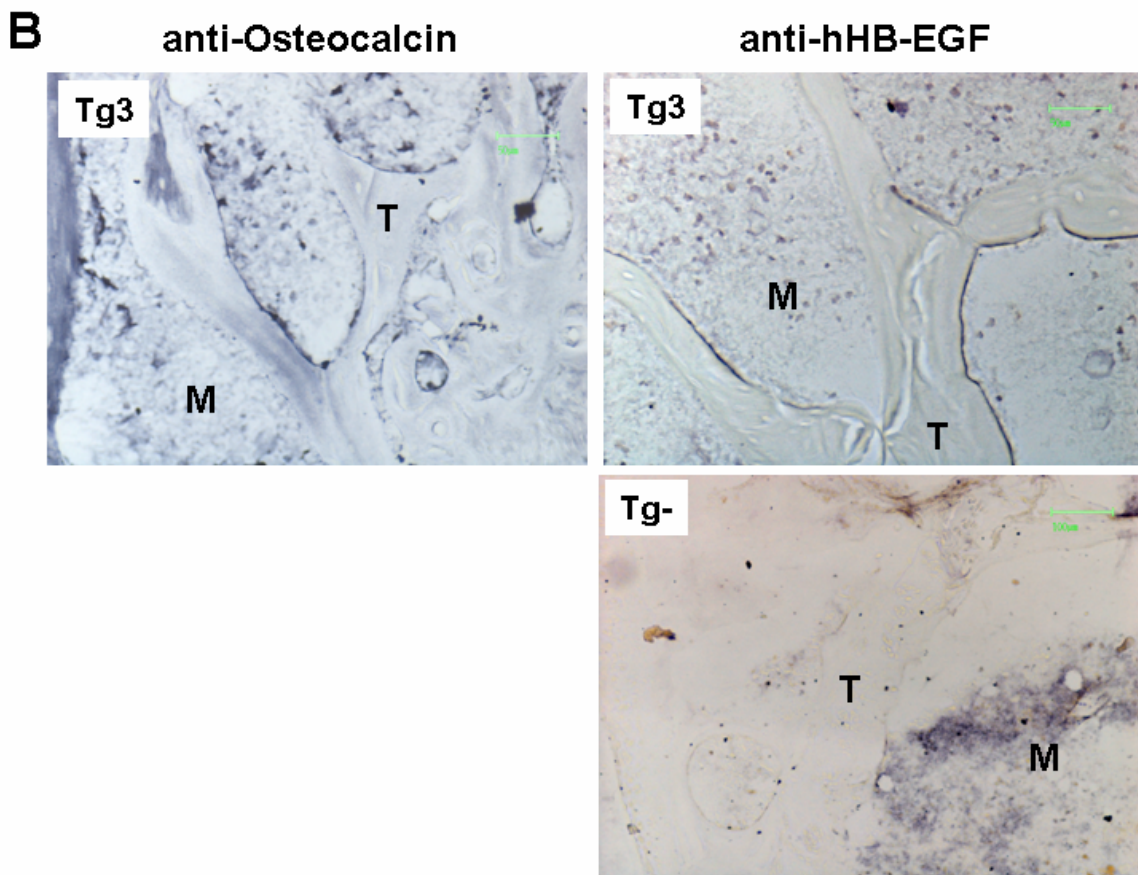
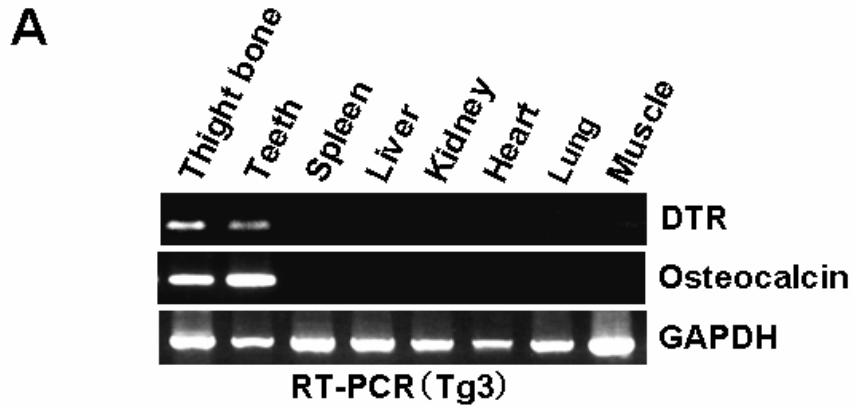


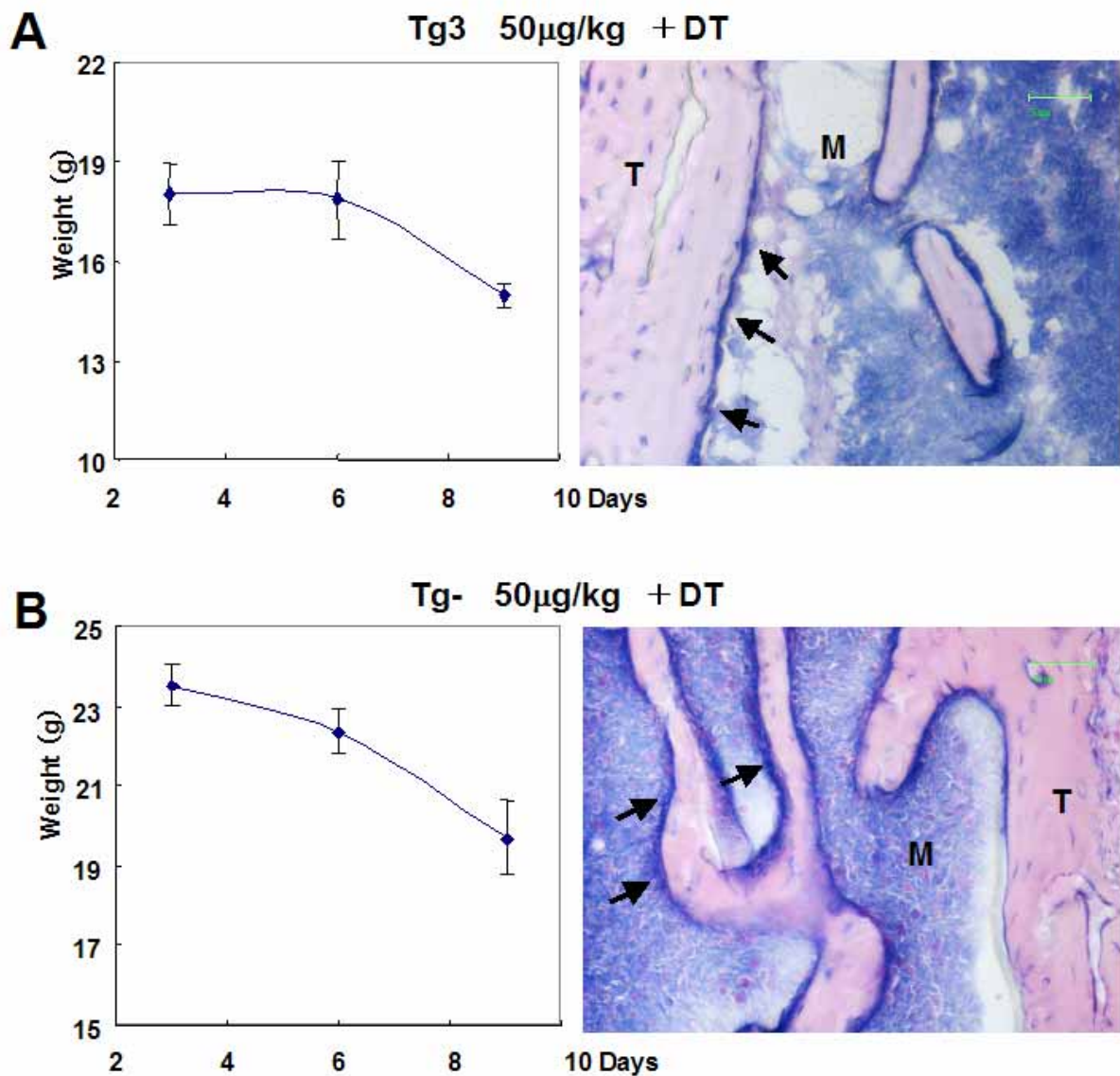
Fig.21 TRECK 骨粗鬆症モデルマウス作製のためのトランスジーン

pOG2-DTR (Fig.19) より *Not* / *Xho* で切り出し精製後、トランスジーンとして使用した。N: *Not*、B: *Bam* H、E: *Eco* R、X: *Xho*



**Fig.22 Tg マウスの発現解析**

- A. 骨組織特異的な hHB-EGF (DTR) の発現を確認するため、骨組織及びその他の組織より RNA を回収し RT-PCR を行った。
- B. Tg3 の Osteocalcin (凍結切片) 及び hHB-EGF (パラフィン切片) の免疫染色。M は骨髄 (marrow)、T は海綿骨 (trabecular bone) 示す。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。



**Fig.23 OG2-DTR-Tg3 50 $\mu$ g/kg の DT 連続投与**

Tg3・雌 (A) 及び Tg-・雄 (B) に 50 $\mu$ g/kg の DT を 3 日毎に投与し体重を計測した。また、DT 投与 10 日後 (3 回投与) に生存していた個体から組織を回収し酸脱灰後、大腿骨海面骨部分の HE 染色を行った。M は骨髓 (marrow)、T は海綿骨 (trabecular bone)、青色のシグナルで検出される海綿骨表面に存在する骨芽細胞はで示す。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。



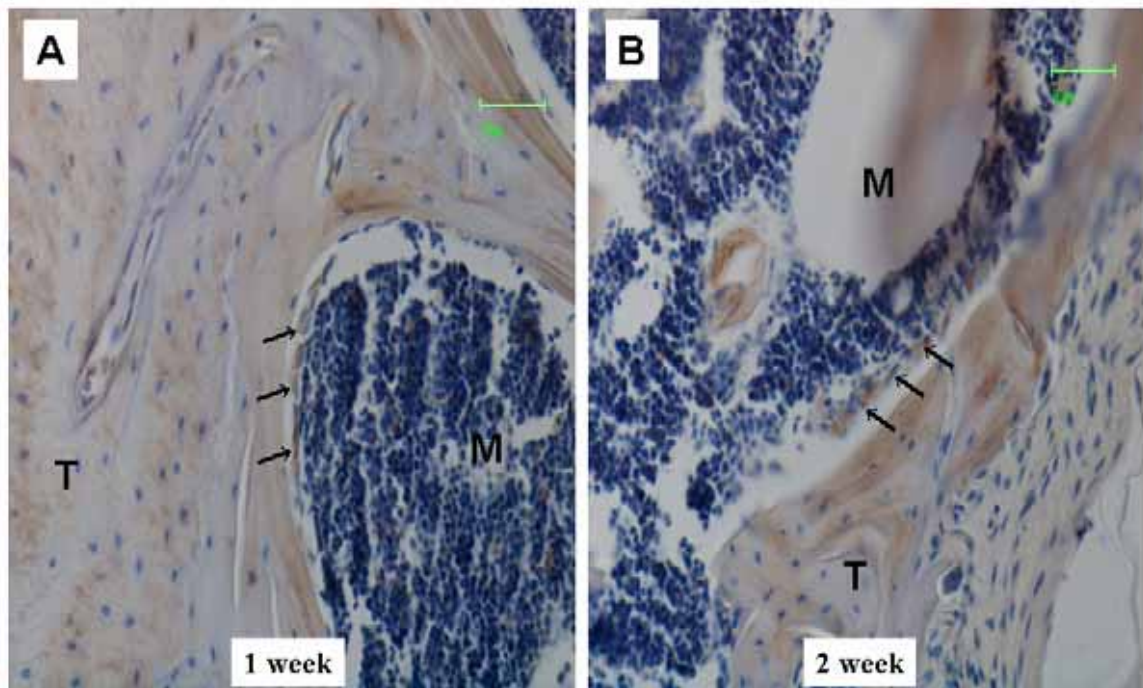
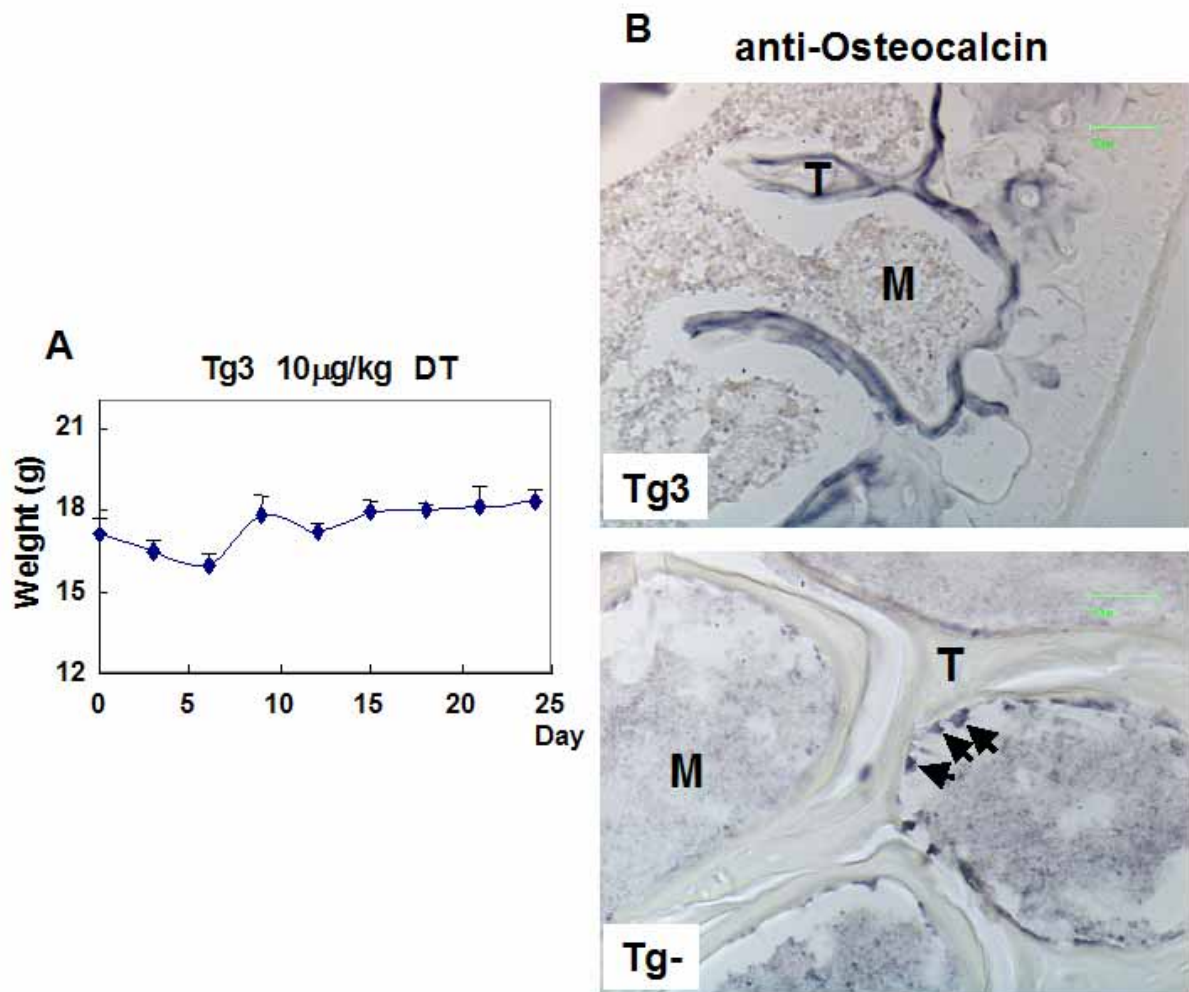


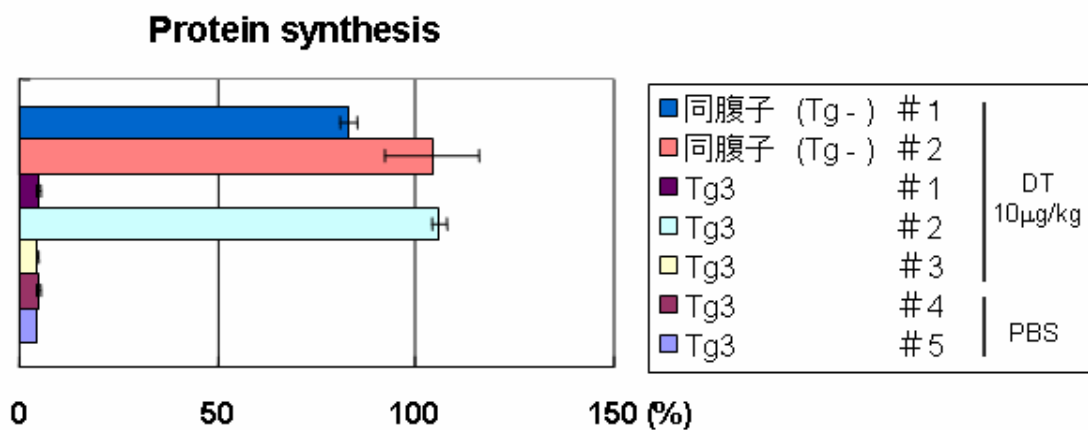
Fig.24 1週間及び2週間にわたる10 $\mu$ g/kgのDT連続投与

OG2-DTR-Tg3について10 $\mu$ g/kgのDTを1週間(A)及び2週間(B)連続投与を行った後、大腿骨海綿骨のオステオカルシンの免疫染色を行った。Mは骨髓(marrow)、Tは海綿骨(trabecular bone)を示し、シグナルが褐色で検出される骨芽細胞は矢印で示している。スケールバーは50 $\mu$ mを示す。



**Fig.25 Tg3 10 $\mu$ g/kg の DT 連続投与**

- A. Tg3 に 3 日毎に 10 $\mu$ g/kg の DT 投与と体重計測を行った (n=3) 。エラーバーは標準偏差を示す。
- B. DT 投与開始 1 ヶ月後に組織を摘出して酸脱灰後、凍結切片を作製しオステオカルシンの免疫染色を行った。Anti-Osteocalcin 抗体は 2,500 倍希釈して使用した。M は骨髄 (marrow)、T は海綿骨 (trabecular bone) 示し、シグナルが青色で検出される骨芽細胞は矢印で示す。スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。



**Fig.26 10 $\mu$ g/kg の DT を連続投与した Tg3 の血中残存 DT 活性**

10 $\mu$ g/kg の DT を連続投与したマウスについて、中和抗体を産生しているかどうか DT の血中残存活性を DT 感受性 Vero 細胞のタンパク質合成量を指標に解析を行った。培養上清に何も添加していないときのタンパク質合成量を 100%とした。投与した DT が抗体により中和された場合には、DT 活性が消失しタンパク質合成阻害は起こらない。n=3、エラーバーは標準偏差を示す。

## 2-4. 考察

本研究において、我々は骨芽細胞特異的に DT 受容体である hHB-EGF を発現する Tg マウスを作製することに成功した。骨粗鬆症の病態再現を目的として 50 $\mu$ g/kg の DT を連続投与したが 3M3、Tg-に関わらず 10日後には、ほぼ全ての個体が死亡した。この原因は明らかではないが、RT-PCR により hHB-EGF の骨特異的発現が確認できていることと、同腹子でも同様に個体が死亡するためトランスジーンによる影響ではないと考えられる。10 $\mu$ g/kg で DT 連続投与を行った場合には、1 ヶ月に及ぶ DT の長期間投与が可能であり、骨芽細胞の消失も確認することができたが (Fig.24)、一般的な骨粗鬆症モデルで見られるような病態の再現には至らなかった。

この原因として 骨芽細胞の消失が完全ではない 骨芽細胞が消失し骨形成が停止した後、破骨細胞による骨吸収のみ起こる期間が短いということが考えられる。10 $\mu$ g/kg の DT を 1 ヶ月連続投与した場合に、Tg3 では骨芽細胞を全く検出することができなかつたため (Fig.24B)、おそらく前者の可能性は低いと考えられる。TRECK 法を用いたモデルでは、DT 投与により骨芽細胞が破壊され骨芽細胞と破骨細胞によるリモデリングのバランスが崩れることで骨粗鬆症を発症すると考えられる。そのため、破骨細胞による骨吸収のみ起こる期間が長いほど、より重度の病態を再現することが可能であると推測できる。そのためには、長期的な DT の投与を行う必要があるが、それによりマウスが DT に対する中和抗体を産生してしまうと、DT 投与依存的な骨芽細胞の破壊は困難になる。結果的に、抑制されていた間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が誘導され、骨のリモデリングのバランスが回復した可能性が考えられる。つまり、現在解析している Tg3 では、例え 1 ヶ月以上 DT の連続投与を行ったとしても中和抗体を産生することにより長期的な骨芽細胞の破壊ができなくなり、骨粗鬆症の病態再現は非常に困難であると言える。

一方、thymidine kinase (TK) を用いて ganciclovir (GCV) 投与依存的に骨芽細胞を除去した場合には、1 ヶ月間の投与により骨密度低下や重度の骨格異常などの骨粗鬆症の病態を示すことが報告されている (Corral DA. *et al.*, 1998)。TK を用いたマウスでは GCV の投与を毎日行っていたことから、OG2-DTR マウスにおいても 10 $\mu$ g/kg の DT を毎日投与することで、より早い時期に骨芽細胞の減少が確認できる可能性があり、さらには骨粗鬆症の病態を再現できる可能性が高いと考えられる。そのためには、連続

投与によるDT中和抗体の産生を防ぐ必要がある。そこで、DTに対する抗体を産生しないDT免疫寛容を獲得したマウスを用いることが非常に有効であると考えている。1章で報告したDT免疫寛容マウスはTRECKマウスと交配させるだけで容易にTRECKマウスにDT免疫寛容能を付与することができる。このdouble Tgマウス用いれば、長期間に渡る複数回のDT投与が可能になるため骨粗鬆症の病態再現が容易になると考えている。先程のTKを用いたマウスでは、投与するGCVがヌクレオチドアナログであるため増殖の盛んな細胞しか標的にすることができない。そのため、骨代謝回転の活発な若い個体についてしか研究できない。これに対して、TRECKモデルの場合は、細胞の増殖速度に関わらずDT受容体を発現していれば良いので、どの週齢マウスでもDT投与による病態再現が可能であるという点で大きく異なっている。

骨粗鬆症には様々な因子の関与が指摘されておりその原因も多様であるが骨芽細胞の機能に着目した場合、骨芽細胞への分化能の低下や骨基質分泌能の低下など、いわゆる老化が原因であると指摘されている。そのためテロメラーゼの導入による骨芽細胞の寿命を延長させた骨芽細胞や、BMPのなど骨基質の分泌促進因子を導入し骨形成能を向上させた骨芽細胞を骨粗鬆症マウスに移植することで骨形成が促進されることが期待できる。また、多量の骨芽細胞を新たに病態部分へ導入することで症状を改善することも期待できる。ドナー細胞としては、自己由来の細胞が拒絶反応を抑えることができるため最も適していることは言うまでもない。胚性幹細胞の利用は倫理的な面から実際の治療への応用は現段階では非常に困難である。そのため、体性幹細胞の有効利用が必要になるが、これまで体性幹細胞は体の中心部にある細胞が多くその採取は、患者に非常重度の負荷がかかっていた。今日の再生医療研究の発展は目覚しく、その中で新たな体性幹細胞として期待されているのが脂肪細胞である。これまで用いられて来た体性幹細胞とは異なり、脂肪細胞は皮下から容易かつ大量に採取でき患者への負担も少ないことからその有用性が期待されている。そもそも、脂肪細胞や骨芽細胞、筋細胞などは、中胚葉由来の細胞であるため脂肪細胞を脱分化させて新たに分化誘導をかけると、骨芽細胞や筋細胞に分化させることが可能であるという報告が得られている(Yagi K. *et al.*, 2004)。そのため、骨の再生における脂肪細胞の利用はかなり現実味を帯びてきている。

これらの骨芽細胞の移植実験においては、本研究で作製したTRECK骨粗鬆症マウスの利用が最も適していると考えている。なぜなら、DT投与

を続けることで常にレシピエント由来の骨芽細胞にのみダメージを与えることが可能であり、移植するドナー由来骨芽細胞には影響を与えないので、その機能を正確にモニターできるためである。ステロイド性骨粗鬆症の場合、骨芽細胞がアポトーシスを起こすため骨形成の誘導は期待できず、一般的な治療法としては骨吸収抑制剤に頼るしかない。しかしながら、骨吸収の抑制のみでは症状の悪化を抑える程度で骨粗鬆症の治療には不十分であり、骨形成を促す治療法が求められている。そのため、今後このTRECK 骨粗鬆症モデルマウスが年々増加し続ける骨粗鬆症患者の苦痛を和らげ高齢者のより快適な生活に貢献できるよう、骨形成を促進する新しい骨粗鬆症の治療法開発に利用されることが期待される。

## 2-5.謝辞

本研究のテーマを与えてくださり直接ご指導して頂いた河野憲二教授、齋藤美知子助教、研究を行うにあたりご指導ご助力をして頂いた都留秋雄助教、木俣行雄助教にお礼申し上げます。Vero 細胞や精製 EF-2 を供与頂いた大阪大学微生物病研究所、目加田英輔教授にお礼申し上げます。また、ジフテリア毒素の構造については本研究科生態高分子構造学講座の児島長次郎准教授にご助言を頂きました。さらに、Tg マウス作製に関与して頂いた高橋一彰氏、骨芽細胞培養株を供与して頂いた本研究科動物遺伝子機能学講座の川市正史教授にお礼申し上げます。また、骨組織解析の手技については本研究科動物遺伝子機能学講座の岡千緒助教及び小島久恵氏にご指導頂きました。最後に、様々なご助言やご協力を頂きました河野研の皆様にお礼を申し上げます。

## 引用文献

Adams TE. (1990). Tolerance to self-antigens in transgenic mice. *Mol Biol Med* 7:341-357

Anderson P. (1983). Antibody responses to Haemophilus influenza type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM197. *Infect Immun* 39:233-238

Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, Asanuma H, Sanada S, Matsumura Y, Takeda H, Beppu S, Tada M, Hori M, Higashiyama S. (2002). Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8:35-40

Askelof P, Rodmalm K, Wrangsell G, Larsson U, Svenson SB, Cowell JL, Unden A, Bartfai T. (1990). Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1347-1351

Bazan JF, Koch-Nolte F. (1997) Sequence and structural links between distant ADP-ribosyltransferase families. *Adv Exp Med Biol.* 419:99-107.

Borrelli E, Heyman R, Hsi M, Evans RM. (1988). Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7572-7576

Breitman ML, Clapoff S, Rossant J, Tsui LC, Glode LM, Maxwell IH, Bernstein A. (1987). Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science* 238:1563-1565

Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TJ, Kremer M, Wunderlich FT, Jung S, Waisman A. (2005). A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2:419-426



Buzzi, Silvio, Rubboli, Diego, Buzzi, Giorgio, Buzzi, Anna Maria, Morisi, Claudio, Pironi, Flavio. (2004). CRM197 (nontoxic diphtheria toxin): effects on advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 53:1041-1048

Church GM, Gilbert W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1991-1995

Corral DA, Amling M, Priemel M, Loyer E, Fuchs S, Ducy P, Baron R, Karsenty G. (1998). Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13835-13840

Collier, RJ. ( 1982 ) in *ADP-ribosylation Reactions: biology and medicine* ( Hayaishi, O., Ueda, K. eds. ) pp 575-592, Academic Press, New York

Collier RJ. (2001). Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon*. Nov;39 (11):1793-1803

Draper RK, Simon MI. (1980). The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J Cell Biol* 87:849-854

Frankel AE, Neville DM, Bugge TA, Kreitman RJ, Leppla SH. ( 2003 ) Immunotoxin therapy of hematologic malignancies. *Semin Oncol*. Aug; 30 ( 4 ) :545-557.

Fu H, Blanke SR, Mattheakis LC, Collier RJ. (1997). Selection of diphtheria toxin active-site mutants in yeast. Rediscovery of glutamic acid-148 as a key residue. *Adv Exp Med Biol* 419:45-52

Furukawa N, Saito M, Hakoshima T, Kohno K ( 2006 ) . A diphtheria toxin receptor deficient in epidermal growth factor-like biological activity. *J*

*Biochem (Tokyo)* 140:831-841.

Heyman RA, Borrelli E, Lesley J, Anderson D, Richman DD, Baird SM, Hyman R, Evans RM. (1989). Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2698-2702

Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O. (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem* 243:3553-3555

Iha H, Tsurugi K. (1998). Shuttle-vector system for *Saccharomyces cerevisiae* designed to produce C-terminal-Myc-tagged fusion proteins. *Biotechniques* 25:936-938

Ishii-Kanei C, Uchida T, Yoneda M. (1979). Isolation of a cured strain from *Corynebacterium diphtheriae* PW8. *Infect Immun* 25:1081-1083

Ivankovic M, Rubelj I, Matulic M, Reich E, Brdar B. (2006). Site-specific mutagenesis of the histidine precursor of diphthamide in the human elongation factor-2 gene confers resistance to diphtheria toxin. *Mutat Res.* Oct 10; 609(1):34-42.

Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA. (2002). In vivo depletion of CD11c (+) dendritic cells abrogates priming of CD8 (+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220

Kageyama T, Ohishi M, Miyamoto S, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E. (2007). Diphtheria Toxin Mutant CRM197 Possesses weak EF2-ADP-ribosyl Activity that Potentiates its Anti-tumorigenic Activity. *J Biochem (Tokyo)*. May 24

Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A. (1994). in *Methods in Yeast Genetics; A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor

Laboratory Press

Kimata Y, Harashima S, Kohno K. (1993). Expression of non-ADP-ribosylatable, diphtheria toxin-resistant elongation factor 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 31; 191 (3):1145-1151.

Kimata Y, Kohno K. (1994) Elongation factor 2 mutants deficient in diphthamide formation show temperature-sensitive cell growth. *J Biol Chem*. May 6; 269(18):13497-13501.

Kohno K, Uchida T, Mekada E, Okada Y. (1985). Characterization of diphtheria-toxin-resistant mutants lacking receptor function or containing nonribosylatable elongation factor 2. *Somat Cell Mol Genet* 11:421-431

Kohno K, Uchida T, Ohkubo H, Nakanishi S, Nakanishi T, Fukui T, Ohtsuka E, Ikehara M, Okada Y. (1986). Amino acid sequence of mammalian elongation factor 2 deduced from the cDNA sequence: homology with GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4978-4982

Kohno K, Uchida, T. (1987) Highly frequent single amino acid substitution in mammalian elongation factor 2 (EF-2) results in expression of resistance to EF-2-ADP-ribosylating toxins. *J Biol Chem*. 262: 12298-12305.

Koshikawa N, Takenaga K. (2005). Hypoxia-regulated expression of attenuated diphtheria toxin A fused with hypoxia-inducible factor-1alpha oxygen-dependent degradation domain preferentially induces apoptosis of hypoxic cells in solid tumor. *Cancer Res* 65:11622-11630

Lai JC, Fukushima A, Wawrousek EF, Lobanoff MC, Charukamnoetkanok P, Smith Gill SJ, Vistica BP, Lee RS, Egwuagu CE, Whitcup SM, Gery I (1998). Immunotolerance against a foreign antigen transgenically expressed in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2049-2057

Leong D, Coleman KD, Murphy JR. (1983). Cloned fragment A of

diphtheria toxin is expressed and secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli* K12. *Science* 220:515-517

Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366:740-742

Mallet VO, Mitchell C, Guidotti JE, Jaffray P, Fabre M, Spencer D, Arnoult D, Kahn A, Gilgenkrantz H. (2002). Conditional cell ablation by tight control of caspase-3 dimerization in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 20:1234-1239

Mattheakis LC, Shen WH, Collier RJ. (1992). DPH5, a methyltransferase gene required for diphthamide biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. Sep; 12(9):4026-4037.

Mekada E, Okada Y, Uchida T. (1988). Identification of diphtheria toxin receptor and a nonproteinous diphtheria toxin-binding molecule in Vero cell membrane. *J Cell Biol* 107:511-519

Miller JF, Morahan G, Allison J. (1989). Immunological tolerance: new approaches using transgenic mice. *Immunol Today* 10:53-57

Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E. (1995). Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem* 270:1015-1019

Miyamoto S, Hirata M, Yamazaki A, Kageyama T, Hasuwa H, Mizushima H, Tanaka Y, Yagi H, Sonoda K, Kai M, Kanoh H, Nakano H, Mekada E. (2004). Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. *Cancer Res* 64:5720-5727

Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. (2006). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel

targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci* 97:341-347

Morita S, Kojima T, Kitamura T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7:1063-1066

Moskaug JO, Stenmark H, Olsnes S. (1991). Insertion of diphtheria toxin B-fragment into the plasma membrane at low pH. Characterization and topology of inserted regions. *J Biol Chem* 266:2652-2659

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199

Palmiter RD, Behringer RR, Quaife CJ, Maxwell F, Maxwell IH, Brinster RL. (1987). Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* 50:435-443

Palmiter R. (2001). Interrogation by toxin. *Nat Biotechnol* 19:731-732

Pappenheimer AM Jr. (1977). Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 46:69-94

Pappenheimer AM Jr, Harper AA, Moynihan M, Brockes JP. (1982). Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J Infect Dis* 145:94-102

Peters VB, Sood SK. (1996). Immunity to Haemophilus influenza type b polysaccharide capsule after vaccination with the complete series of oligosaccharide CRM197 conjugate vaccine in infants with human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr* 128:363-365

Porro M, Saletti M, Nencioni L, Tagliaferri L, Marsili I. (1980). Immunogenic correlation between cross-reacting material (CRM197) produced by a mutant of Corynebacterium diphtheriae and diphtheria toxoid.

*J Infect Dis* 142:716-724

Rappuoli, R. (1983). Isolation and characterization of *Corynebacterium diphtheriae* nontandem double lysogens hyperproducing CRM197. *Appl Environ Microbiol* 46:560-564

Rappuoli R, Douce G, Dougan G, Pizza M. (1995). Genetic detoxification of bacterial toxins: a new approach to vaccine development. *Int Arch Allergy Immunol* 108:327-333

Rothstein EP, Madore DV, Long SS. (1991). Antibody persistence four years after primary immunization of infants and toddlers with *Haemophilus influenzae* type b CRM197 conjugate vaccine. *J Pediatr* 119:655-657

Ross SR, Graves RA, Spiegelman BM. (1993). Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity. *Genes Dev* 7:1318-1324

Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, Mekada E, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 19:746-750

Sandvig K, Olsnes S. (1980). Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol* 87:828-832

Smith CA, Graham CM, Mathers K, Skinner A, Hay AJ, Schroeder C, Thomas DB. (2002). Conditional ablation of T-cell development by a novel viral ion channel transgene. *Immunology* 105:306-313

Tweten RK, Barbieri JT, Collier RJ (1985). Diphtheria toxin. Effect of substituting aspartic acid for glutamic acid 148 on ADP-ribosyltransferase activity. *J Biol Chem* 260:10392-10394

Uchida, T., Pappenheimer, A-M. Jr, and Greany, R. (1973) Diphtheria

toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. *J Biol Chem* 248: 3838-3844.

Uchida, T., Pappenheimer, A-M. Jr, and Harper, A-A. ( 1973 ) Diphtheria toxin and related proteins. III. Reconstitution of hybrid "diphtheria toxin" from nontoxic mutant proteins. *J Biol Chem* 248: 3851-3854.

Van Ness BG, Howard JB, Bodley JW. (1978). Isolation and properties of the trypsin-derived ADP-ribosyl peptide from diphtheria toxin-modified yeast elongation factor 2. *J Biol Chem* 253:8687-8690

Winston F, Dollard C, Ricupero-Hovasse SL. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*. Jan; 11(1):53-55.

Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K. (2004). A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 321:967-974

Yagi H, Miyamoto S, Tanaka Y, Sonoda K, Kobayashi H, Kishikawa T, Iwamoto R, Mekada E, Nakano H. (2005). Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in peritoneal fluid of ovarian cancer. *Br J Cancer* 92:1737-1745

Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15:245-250

Yates SP, Jorgensen R, Andersen GR, Merrill AR. (2006). Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. *Trends Biochem. Sci.*Feb; 31(2):123-133.

Zhao, L., and Haslam, D-B. ( 2005 ) A quantitative and highly sensitive luciferase-based assay for bacterial toxins that inhibit protein synthesis. *J Med Microbiol* 54: 1023-1130.

岩脇隆夫 (1997) 動物個体内での組織特異的細胞ノックアウト法の開発  
奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 9571016)

古川智久 (2003) 改良型ジフテリア毒素受容体の作成と解析 奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 0171095)

木村泰子 (2004) ジフテリア毒素免疫寛容マウスの作製 ~ 毒素受容体を介した細胞ノックアウト法の改良 ~ 奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 0271045)