

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08480

研究課題名(和文) 志賀毒素の細胞内輸送を標的とした新規腸管出血性大腸菌感染症治療薬の創出

研究課題名(英文) Development of a novel Shiga toxin inhibitor that targeting of intracellular transport of the toxin

研究代表者

高橋 美帆 (Takahashi, Miho)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：00446569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：志賀毒素(Stx1a)の細胞内小胞輸送に対するStx1a阻害剤MMA-tet, FRA-tetの影響を詳細に解析するために、様々なキナーゼの基質ペプチドをスポットしたスライドグラスを作成し、本スライドグラスを用いて阻害剤存在下あるいは非存在下、Stx1a刺激により活性化されるキナーゼ群を検出する系を確立した。また、4価型構造のペプチドをセルロースメンブレン上にスポット合成し、より強いStx1a毒性阻害作用を持つモチーフを探索するための新たなスクリーニング系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We synthesized substrate peptides of various kinases on a slide glass and using this, we analyzed the activities of kinases stimulated by Stx1a in the presence or absence of Stx inhibitors (MMA-tet, FRA-tet). We established a new multivalent peptide library screening by using tetravalent peptides synthesized on a cellulose membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：志賀毒素 細胞内小胞輸送 ペプチド 阻害剤 ペプチドライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

O157:H7 に代表される腸管出血性大腸菌 (EHEC) による感染は、下痢や出血性大腸炎のみならず、溶血性尿毒症症候群や脳症等の重篤な合併症を併発する。本感染症に対し抗生物質が投与されているが、抗生物質の使用については WHO の治療指針でも検討課題となっており、いまだに有効な治療薬は確立されていない。

Stx は EHEC の主要な病原因子であり、ごく微量でも血中に侵入した場合には、腎臓や脳を障害し、致命的な合併症を引き起こす。Stx は Stx1 と Stx2 の 2 つのファミリーから構成され、各々には Stx1a, 1c, 1d ならびに Stx2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g の複数のバリエーションが存在する。これら Stx は AB5 型毒素で、B サブユニット 5 量体は標的細胞膜上の糖脂質 Gb3 を受容体とし、そのグロボ 3 糖部分を特異的に認識する。B サブユニット 1 分子には 3 種類のグロボ 3 糖結合部位 (サイト 1 ~ 3) が存在しており、5 量体では最大 15 分子のグロボ 3 糖が結合し、これにより結合親和性が著しく亢進する。これをクラスター効果と呼ぶ。このため、天然物あるいは低分子化合物ライブラリーからのスクリーニング、ファージディスプレイ法等の従来技術では、原理的にこのクラスター効果に打ち勝ち、Stx の毒性を強力に阻害する薬剤を開発することは非常に困難であり、またその例もない。

これまでに我々は、それ自体がクラスター効果を発揮する多価型ペプチドライブラリーを独自に開発し、StxB サブユニットの特定受容体結合部位を標的として本ライブラリーをスクリーニングすることにより、様々な Stx バリエーションに対するペプチド性阻害薬 (4 価のペプチドから構成される) の開発に成功している。Stx2aB サブユニットのサイト 3 を標的とした阻害薬 PPP-tet (PCT/JP2005/012286, 特許第 4744443 号、FASEB J., 2006, 20, 2597-, Infect. Immun. 2010, 78, 177-)、Stx1aB サブユニットのサイト 1 を標的とした阻害薬 MMA-tet (特願 2010-019728, Infect. Immun., 2013, 81, 2133-)を開発した。特に PPP-tet については、マウスを用いた感染実験のみならず、サルに対する Stx2 の致死毒性に対して、非常に高い治癒効果を示す (Pediatr. Nephrol., 2011, 26, 2031-, Nature Med. NEWS, 2011, 17, 755)。さらにその後、1 枚のセルロースシート上に、クラスター効果を発揮させた状態で最大 384 個のペプチドをスポット合成する技術を新たに確立し、本シートを用いたスクリーニングを先の技術と組み合わせることにより、Stx1a B サブユニットのサイト 2 を標的とし、60 種以上の候補モチーフを取得することに成功した。そのうち 11 種類 (FRA-tet 他 10 種) については阻害薬として確立した

(submitted)。

また興味深いことに、PPP-tet ならびに MMA-tet は、それぞれ Stx の受容体結合領域の特定の部位に結合するものの、Stx の細胞への結合を全く阻害しないことが明らかとなった。そこで PPP-tet と MMA-tet の Stx 毒性阻害作用機構を詳細に解析したところ、以下のことを見出した。Stx は、標的細胞上の Gb3 に結合した後エンドサイトーシスされ、小胞に乗ってエンドソームからゴルジ体、さらにゴルジ体から小胞体 (ER) へと逆行輸送され、ER から毒性本体である A サブユニットが Sec61 依存的に細胞質に放出、毒性を発揮するが、PPP-tet は Stx2a のゴルジ体から ER への輸送を (FASEB J., 2006, 20, 2597-, Infect. Immun., 2010, 78, 177-)、MMA-tet は、ER 以降の A サブユニットの輸送を (Infect. Immun., 2013, 81, 2133-)、それぞれ阻害することで、強力な毒性阻害作用を発揮していることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は、Stx1a B サブユニットのサイト 1 を標的とする MMA-tet と、サイト 2 を標的とする FRA-tet とを同時に投与すると、単独で使用した場合よりも Stx1a 阻害効果が相乗的に増強することを見出した (総ペプチド濃度は同じ)。さらに興味深いことに、このとき Stx1a のゴルジ体への輸送が著しく遅延していることを見出した。このことは標的とする受容体結合サイトが異なる 2 種の阻害薬を組み合わせることで、EHEC 感染に対する治療効果を顕著に増強できる可能性があることを示している。

そこで本研究では、以下を達成目標とする。  
(1) FRA-tet 以外のサイト 2 を標的とする 10 種の阻害薬についても同様の検討を行い、相乗的な阻害効果を発揮するものを同定し、さらに Stx1a の細胞内輸送に及ぼす影響を詳細に検討する。

(2) MMA-tet と FRA-tet に代表される相乗的な阻害効果を示す組み合わせについて、その毒性阻害機構を分子レベルで解明する。

(3) その分子機構に基づいて、それぞれの阻害薬の構造をテラーメードで最適化する新規技術を確立する。

(4) 個々に最適化された阻害薬の組み合わせを用いて、マウスを用いた EHEC 感染実験における効果を検討し、これまでにない高い有効性を示す新規治療薬を創出する。

## 3. 研究の方法

### (1) MMA-tet との組み合わせにより相乗的阻害効果を発揮するものの同定

Stx1a B サブユニットのサイト 2 を標的とする FRA-tet 以外の 10 種の阻害薬について、相乗的な阻害効果を発揮するものを同定する。同定された阻害薬を MMA-tet と併用した場合の蛍光標識 Stx1a の細胞内輸送への影

響は、共焦点レーザー顕微鏡を用い、種々のオルガネラマーカーとの共局在性を調べることにより評価する。

## (2) 相乗的毒性阻害機構の分子メカニズムの解明

MMA-tet と相乗的阻害効果がみられた阻害薬について、Stx1a 刺激により活性化される各種シグナル伝達分子への影響を検討する。

## (3) 阻害薬構造のテラーメード最適化を可能にする新規技術の確立

多価型ペプチドライブラリー法と Intavis 社のスポット合成を組み合わせ、一度に数百種類の多価型ペプチドライブラリーをセルロースメンブレン上にスポット合成する系を確立する。

## 4. 研究成果

(1) Stx1a B サブユニットのサイト2を標的とする阻害ペプチド、KGA-tet, YTA-tet, PQA-tet の3種類の4価ペプチドについて、FRA-tet と同様、MMA-tet との組み合わせにより、相乗的な Stx1 毒性阻害効果を示した。これらペプチドを MMA-tet と同時投与した際の Stx1a 細胞内輸送に及ぼす影響を検討したところ、いずれのペプチドにおいても、MMA-tet 単独投与時と比較して Stx1a の細胞内輸送に大きな変化は見られなかった。従って以降は MMA-tet と FRA-tet の組み合わせを用いることとした。

(2) ペロ細胞を用いて、MMA-tet と FRA-tet を組み合わせて添加した場合の細胞内シグナル伝達分子の影響を検討した。MMA-tet, FRA-tet を単独で作用させた場合には、いずれのペプチドも Stx1a による ERK の活性化を阻害するが、JNK, p38, Akt の活性化は阻害しないことが示された。また、MMA-tet と FRA-tet を組み合わせた場合、Stx1a による ERK の活性化を阻害するが、この効果はペプチドを単独で作用させた場合と比べて同程度であることがわかった。一方、JNK, p38, Akt の活性化は影響を及ぼさないことも明らかとなった。このことから、MMA-tet と FRA-tet を組み合わせて投与した場合に見られる Stx1a の細胞内輸送遅延は、ERK 活性化制御のみでは不十分であり、JNK, p38, Akt の活性化抑制は関与していないことが示された。

Stx1a 刺激時に活性化されるシグナル伝達分子に対するペプチドの効果を網羅的解析するため、キナーゼ基質アレイを用いた系の確立を試みた。セリンスレオニンキナーゼの基質ペプチドをスライドグラスにスポット合成し、本スライドグラスを用いて Stx1a によって活性化される細胞内セリンスレオニンキナーゼ群に対する Stx1a 阻害ペプチドの効果を検討した。Stx1a 刺激により活性化される ERK は阻害ペプチドによって抑制されること、一方 p38, AKT の活性化は影響を受けないことが示され、これまでの知見と一致して

いたことから、本系が確立されたと言える。Stx1a と MMA-tet, FRA-tet をペロ細胞に添加した場合、アクチンフィラメントの細胞膜への局在が増加していること、アクチンフィラメントと細胞膜を架橋するタンパク質 Ezrin の細胞膜への局在が増加していることが示された。

(3) 各阻害薬をより強い阻害作用を持つ分子に進化させるために、多価型ペプチドライブラリーをセルロースメンブレン上にスポット合成し、本メンブレンを用いて優れたモチーフを取得する新たな系を確立した。メンブレン上に合成する多価型ペプチドの構造最適化を行った。最終的にメンブレン上のアミノ基に Ala とアミノヘキサ酸を付加し、さらにペプチド鎖を分岐させるために Lys (Lys の主鎖と側鎖両方のアミノ基を用いる) を2分子導入することで、4価型ペプチドを合成することが可能になった。また、本系の確立のために、Stx2 のサブタイプである Stx2d に対する阻害モチーフの同定を試みたところ、Stx2d の毒性を選択的に阻害するモチーフを取得することができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1) Pleckstrin homology domain of p210 BCR-ABL interacts with cardiolipin to regulate its mitochondrial translocation and subsequent mitophagy. Shimasaki K., Watanabe-Takahashi M., Umeda M., Funamoto S., Saito Y., Noguchi N., Kumagai K., Hanada K., Tsukahara F, Maru Y., Shibata N., Naito M., Nishikawa K. **Genes to Cells**,23(1),22-34.,2018. 査読有

2) M-COPA, a novel Golgi system disruptor, suppresses apoptosis induced by Shiga toxin. Hattori T., Watanabe-Takahashi M., Shiina I., Ohashi Y., Dan S., Nishikawa K., Yamori T., Naito M. **Genes to Cells**,21(8), 901-906, 2016. 査読有

3) Affinity-based screening of tetravalent peptides identifies subtype-selective neutralizers of Shiga toxin 2d, a highly virulent subtype, by targeting a unique amino acid involved in its receptor recognition., Mitsui T., Watanabe-Takahashi M., Shimizu E., Zhang B., Funamoto S., Yamasaki S., Nishikawa K., **Infect. Immun.**, 84: 9: 2653-2661, 2016. 査読有

4) Proteasome inhibitors prevents cell death and prolongs survival of mice challenged by Shiga Toxin., Hattori T., Watanabe-Takahashi M., Ohoka N., Hamabata T., Furukawa K., Nishikawa K., Naito M., **FEBS Open Bio.**,12;5:604-614, 2015. 査読有

5) Development of a novel tetravalent synthetic peptide that binds to phosphatidic acid. Ogawa R., Nagao K., Taniuchi K., Kato U., Hara Y., Inaba T., Kobayashi T., Sasaki Y., Akiyoshi K., Watanabe-Takahashi M., Nishikawa K., Umeda M. **PLoS One** Jul 6;10(7): e0131668. doi: 10.1371/journal.pone.0131668., 2015 査読有

6) Identification of a wide range of motifs inhibitory to shiga toxin by affinity-driven screening of customized divalent peptides synthesized on a membrane., Watanabe-Takahashi M\*, Kato M\*, Shimizu E, Nishikawa K.\*These authors contributed equally to this work., **Appl. Environ. Microbiol.**, 81 · 3, 1092-1100, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1) 「p210 型 BCR-ABL PH ドメインのリガンド特性およびその病理的意義の解明」島崎健太郎、高橋美帆、梅田真郷、舟本聡、斎藤芳郎、野口範子、熊谷圭悟、花田賢太郎、丸義郎、柴田誠人、内藤幹彦、西川喜代孝、第 90 回日本生化学会、神戸、2017

2) 「新規 CaMKIV 特異的阻害ペプチドによる破骨細胞分化制御」中村友美、高橋美帆、藤原誠、西園貴志、西村浩輝、尾藤晴彦、高柳広、田口佑、井上純一郎、西川喜代孝、第 90 回日本生化学会、神戸、2017

3) 「Stx2 は exosome に組み込まれて細胞外へ分泌され強い個体毒性を示す」高橋美帆、元山純、山手文至、山崎伸二、西川喜代孝、第 21 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、鹿児島、2017

4) 「X 線結晶構造解析によるペプチド性 Stx 阻害薬の新たな阻害機構の解明」玉田真一、高橋美帆、千田美紀、奥田明子、宮澤淳夫、千田俊哉、西川喜代孝、第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、富山、2016

5) 「新規ペプチド性コレラ毒素阻害薬のマウス腸管水分貯留に対する阻害効果」雲井香保里、高橋美帆、山本洋、濱端崇、西川喜代孝、第 89 回日本生化学会、仙台、2016

6) 「ヘマグルチニンを標的とした新規作用機構を有するインフルエンザ阻害ペプチドの開発」近江純平、高橋美帆、猪飼桂、Ching-Yi Tseng, 名取泰博、山下誠、西川喜代孝、第 89 回日本生化学会、仙台、2016

7) 「ヘマグルチニンを標的とした新規作用機構を有する抗インフルエンザ薬の開発」近江純平、高橋美帆、猪飼桂、西川侑紀、Jean Tseng, 名取泰博、西川喜代孝、BMB2015、神戸、2015

8) Affinity-driven screening of customized divalent peptides synthesized on a membrane identifies a wide range of inhibitory motifs against Shiga toxin, Miho Watanabe-Takahashi, Mihoko Kato, Eiko Shimizu, Kiyotaka Nishikawa. VTEC2015, Boston, 2015

9) 「新規小胞輸送阻害薬を用いた志賀毒素による細胞死の抑制」服部隆行、高橋美帆、椎名勇、大橋愛美、旦慎吾、西川喜代孝、内藤幹彦、第 19 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、東京、2015

10) 「ペプチド性 Stx 阻害薬 MMA-tet の作用メカニズムの解明」高橋美帆、奥村早紀、金田彩花、竹中康章、西川喜代孝、第 19 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、東京、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

1. 名称: Stx1 毒性阻害 4 価ペプチドおよびこれを含む疾患治療薬

発明者: 西川 喜代孝、高橋 美帆、加藤 美帆子

権利者: 学校法人同志社

種類: 日本特許

番号: 特願 2015-055399

出願年月日: 平成 27 年 3 月 18 日

国内外の別: 国内

2. 名称: LT 阻害 4 価ペプチドおよび ETEC 感染症治療薬

発明者: 西川 喜代孝、高橋 美帆、谷川 哲也

権利者: 学校法人同志社

種類: 日本特許

番号: 特願 2015-123217

出願年月日: 平成 27 年 6 月 18 日

国内外の別: 国内

3. 名称: ヘマグルチニン結合ペプチド、および、これを含むインフルエンザウイルス感染症の予防・治療薬

発明者: 西川 喜代孝、高橋 美帆、近江 純平、山下 誠、本郷 桂、名取 泰博、Ching-Yi, Tseng

権利者: 学校法人同志社

種類: 日本特許

番号: 特願 2016-164971

出願年月日: 平成 28 年 8 月 25 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

1.名称：ペプチドのスクリーニング法  
発明者：西川喜代孝、高橋美帆、加藤美帆子  
権利者：学校法人同志社  
種類：日本特許  
番号：特許第 5718574 号  
取得年月日：平成 27 年 3 月 2 7 日  
国内外の別： 国内

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

高橋 美帆 (TAKAHASHI, Miho)  
同志社大学・生命医科学部・助教  
研究者番号：00446569

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )