様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月 ２４ 日現在

機関番号：３４３１０
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０７１２８

研究課題名（和文）強毒性志賀毒素2含有エキソソーム産生抑制による新規腸管出血性大腸菌感染症治療戦略

研究課題名（英文）Development of a new therapeutic agent that inhibits the production of exosome-associated Shiga toxin 2

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）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：志賀毒素2（Stx2)は標的細胞内に取り込まれた後、積極的に細胞外へ放出されており、一部のStx2はexosome結合型となっている。このStx2の細胞外放出に関与する細胞内小胞輸送関連因子を明らかにするために各種siRNAを用いて解析したところ、Stx2はRab11b特異的な経路を介して細胞外へ放出されていること、Rab11a, Rab27a, Rab27b, Rab35は関与しないことが明らかとなった。またキナーゼ基質ペプチドアレイを用いた検討より、Stxが細胞内に取り込まれた後、Stx1とStx2とでは、細胞内で活性化されるキナーゼに違いがあることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
Stx2が細胞内に取り込まれた後、その一部がエキソソームに結合した状態（exo-Stx2）で細胞外へ放出されるが、このexo-Stx2をマウスに静脈投与した場合、遊離型Stx2に比べマウスに対する個体毒性が増強することがわかっている。従って、exo-Stx2がどのような分子機構で産生されているのかを明らかにし、さらにその産生を制御する分子を同定できれば、Stx2の強毒性に関わる分子を標的とした新しい腸管出血性大腸菌感染症治療薬が開発可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：After being incorporated into target cells, Shiga toxin 2 (Stx2) was actively released from the cells, and part of released Stx2a was associated with exosomes (refer to as exo-Stx2). To determine the intracellular molecules that regulate the production of exo-Stx2, we examined the effect of knockdown of Rabs (Rab11a, Rab11b, Rab27a, Rab27b, and Rab35) on the release of Stx2 in the culture medium. The results showed that the release of Stx2 was inhibited by Rab11b knockdown but not by the other Rabs knockdown, indicating that exo-Stx2 is released by Rab11b dependent machinery. By using a kinase substrate peptide array, we analyzed the hundreds of protein kinases activations in Stx treated cells, and found that the types of activated protein kinases were different between the case with Stx1 and Stx2 in the intracellular transport of Stx.

研究分野：細胞生物学

キーワード：志賀毒素　エキソソーム（エクソソーム）　小胞輸送　プロテインキナーゼ

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症は、下痢、出血性大腸炎などの消化管障害を主症状とし、しばしば溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症等の重篤な合併症を併発する。志賀毒素（Stx）は EHEC の主要な病原因子であり、血中に侵入した Stx が脳、腎臓等を障害することで上記合併症が引き起こされる。Stx は、Stx1 と Stx2 の２つのファミリーからなり、Stx1 と Stx2 のアミノ酸レベルでの相同性はおよそ 56%である。ベロ細胞を用いた検討では、Stx1 と Stx2 の細胞障害活性は同程度であるが、マウスに対する LD50 値で比較すると、Stx2 の方が Stx1 に比べ 500-600 倍、毒性が増強することが示されている。また臨床的にも Stx2 産生菌の方が重篤な合併症発症と密接に関連していることが示されている。しかしながら、なぜ Stx2 のみが個体レベルにおいて強毒性を発揮するのか、その分子機構の詳細は明らかになっていない。

Stx は毒性本体である A サブユニット１分子と標的細胞との結合を担う B サブユニット 5 量体からなる。StxB サブユニット５量体が標的細胞膜上に存在する糖脂質 Gb3 を特異的に認識し、Stx はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、ゴルジ体さらに小胞体へと逆行輸送される。その後細胞質に A サブユニットのみが移行し、A サブユニットのグリコシダーゼ活性によりリボソームのタンパク質合成が阻害される。これまでに我々は、Stx が標的細胞内に取り込まれた後、Stx1 に比べ Stx2 はより積極的に細胞外へ放出されること、このとき Stx2 はリサイクリング経路を介して細胞外へ放出されるが、一部の Stx2 はエキソソームに結合していること（exo-Stx2）、さらに exo-Stx2 は遊離型 Stx2 に比べマウスに対する個体毒性が増強していること、を見出した。特に、致死量以下（0.005-0.015ng/g）の exo-Stx2 を投与したマウスでは、遊離型 Stx2 投与と比較して１日あたりの尿量が数倍～数十倍増加し、さらにこの状態が 1～2 週間持続すること、この時 exo-Stx2 投与マウスでは尿細管上皮細胞の著しい脱落が観察されること、すなわち顕著な腎障害が惹起されることを見出した（Sci.Rep., 8:10776- 2018）。以上の結果は、exo-Stx2 こそが、個体での Stx2 強毒性の本体である可能性を示している。

２．研究の目的

本研究では、上述の exo-Stx2 がどのような分子機構により産生されるのか、特に Stx1 との細胞内輸送の相違を生んでいる根本的な機構は何なのかを明らかにすることを目的とし、さらにその制御分子を開発することにより、これまでにない EHEC 感染症治療戦略の確立を目指す。

３．研究の方法

Stx の細胞内小胞輸送には、種々の小胞輸送関連タンパク質（Rabs, GPP130, SNAREs 等）、ならびにプロテインキナーゼ群（p38, Syk, PKCdelta 等）、が関与していることが知られている(Nat. Microbiol., 2010, 8, 105-, Toxicon, 2012, 60, 1085-)。一方、エキソソームの産生には、MVB 形成に関与する ESCRTs タンパク質複合体や、リサイクリング経路を制御する Rab タンパク質（Rab11, Rab27, Rab35 等）、また、リサイクリング経路において ERK や mTORC1 等を含むプロテインキナーゼ群（DGK, PKD, MEK 等）が関与することが各々報告されている（Mol. Biol. Cell, 2006, 17, 645-, Proc. Natl. Acad. Sci., 2015, 112, 148-, J Biol. Chem.,**2017**,**14**,**5737**-、Cell. Mol. Life. Sci., 2017, doi: 10.1007/s00018-017-2595-9.）。そこで本研究では、小胞輸送関連分子ならびにキナーゼ分子群に着目し、Stx2 特異的な細胞内輸送並びに exo-Stx2 の産生に必須のはたらきをする分子群の同定を行う。

（１）Stx2 の細胞内小胞輸送に対するリサイクリング経路関連タンパク質（Rab タンパク質等）の関与について

リサイクリング経路や MVB 経路を制御する各種 Rab タンパク質（Rab11a，Rab11b，Rab27a，Rab27b，Rab35）を各々siRNA を用いてノックダウンしたベロ細胞に、I^{125}-標識 Stx2 を添加し、経時的に Stx2 の細胞外放出量を定量する。

（２）キナーゼ基質ペプチドアレイを用いた Stx2 細胞内輸送関連キナーゼタンパク質の探索

Intavis 社の Celluspots を用いて、セリンスレオニンキナーゼ基質ペプチドアレイおよびチロシンキナーゼ基質ペプチドアレイを作成する。各キナーゼに対する基質ペプチド 384 種類を Respep SL ペプチド合成機で合成し、スライドグラス上に最大 768 種類スポットする。Stx1 あるいは Stx2 存在下 37 度 30 分間培養したベロ細胞を回収、細胞溶解液（最適濃度 300-500 μg/ml）を上記スライドグラスに添加し、1 時間反応させる。スライドグラス上のリン酸化された基質ペプチドは、Phos-tag Biotin および Streptavidin-HRP を用いてウエスタンブロッティングにより検出する。

（３）各種キナーゼ阻害剤を用いた Stx2 細胞内輸送関連タンパク質の探索

キナーゼ阻害剤ライブラリーを用い、各阻害剤存在下ベロ細胞を 30 分培養後、1 μg/ml の I^{125}-標識 Stx２添加し、2 時間培養する。その後メディウム交換し、1 時間培養後、さらにメディウムを交換、１、２、4 時間培養後の I^{125}-Stx2 細胞外放出量をγ－カウンターにより測定する。Stx2 放出量の減少を指標に、候補キナーゼの同定を行う。

（４）exo-Stx2 産生を効率よく阻害する化合物の同定
（１）、（３）の候補分子阻害剤存在下ベロ細胞を 37 度 30 分培養した後、1 μg/ml I^{125}-標識 Stx２を添加、2 時間培養する。その後メディウム交換し、1 時間培養後、さらにメディウムを交換、４時間培養後の培養上清を回収し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより exo-Stx2 画分の放射線量をγ－カウンターにより測定する。

４．研究成果
（１）Rab11a，Rab11b，Rab27a，Rab27b，Rab35 の siRNA を各々ベロ細胞に添加、48 時間培養後の各 Rab タンパク質量をウエスタンブロッティングにより測定したところ、いずれの Rab タンパク質も 70-90%タンパク質量が減少していることを確認した。次に各種 siRNA 処理した Vero 細胞に１ μg/ml I^{125}-標識 Stx２を添加、37 度、２時間培養後、メディウム交換し、１時間培養後さらにメディウムを交換、４時間培養後の I^{125}-Stx2 細胞外放出量を測定した。その結果、Rab11b をノックダウンした場合には、I^{125}-Stx2 の細胞外放出量がおよそ 30%低下したのに対し、Rab11a，Rab27a,Rab27b，Rab35 をノックダウンした場合では、Stx2 の細胞外放出量に変化は見られなかった。このことから Stx2 は、Rab11b 特異的な経路を介して細胞外へ放出されていることが明らかとなった。

（２）①自作のセリンスレオニンキナーゼ基質ペプチドアレイおよびチロシンキナーゼ基質ペプチドアレイを用いて、Stx 刺激によって活性化される細胞内各種キナーゼの解析を行った。Stx1 あるいは Stx2 存在下、37 度 30 分培養した Vero 細胞の細胞溶解液をスライドグラスに添加し、スライドグラス上のリン酸化ペプチド群を解析した。解析結果より、まず Stx 刺激により活性化されることが報告されているキナーゼ p38，ERK に着目した。Stx１および Stx2 いずれの場合でも、p38，ERK、および本経路に関連するキナーゼ群に対応した基質ペプチドがリン酸化されていることが明らかとなった。上記細胞溶解液について、実際の p38，ERK のリン酸化状態を各リン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析したところ、Stx1 あるいは Stx2 処理細胞いずれにおいても p38,ERK はリン酸化されていることがわかった。これらのことから、自作のペプチドアレイを用いた本系は、Stx 刺激により活性化されるキナーゼを検出する系として利用可能であることが示された。また、Stx1 および Stx2 いずれの場合でも活性化されるキナーゼとして、PKC，AKT、およびその関連キナーゼが確認された。

② 次に、Stx1 あるいは Stx2 いずれかで活性化されるキナーゼの探索を行った。その結果、Stx2 と比較して Stx1 でより強く活性化されているセリンスレオニンキナーゼは 17 種類、チロシンキナーゼは 12 種類、一方、Stx1 と比較して Stx2 でより強く活性化されているセリンスレオニンキナーゼは 17 種類、チロシンキナーゼ 2 種類が各々同定された。このことから、Stx1 と Stx2 とでは細胞内活性化キナーゼパターンに違いがあると考えられる。

（３）上記結果をもとにキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いて、Stx2 の細胞外放出に対する各種阻害剤の効果を検討した。現在までに 20 種類の阻害剤について解析したところ、Stx２の細胞外放出量が 10-30%低下したものが 1 種類、逆に 10-20%増加したものが 1 種類確認されている。その他 60 種類のキナーゼ阻害剤について現在、効果を検討中である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Watanabe-Takahashi M, Yamasaki S, Murata M, Kano F, Motoyama J, Yamate J, Omi J, Sato W, Ukai H, Shimasaki K, Ikegawa M, Tamura-Nakano M8, Yanoshita R, Nishino Y, Miyazawa A, Natori Y, Toyama-Sorimachi N, Nishikawa K.	４．巻 8
２．論文標題 Exosome-associated Shiga toxin 2 is released from cells and causes severe toxicity in mice.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Scientific reports	６．最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-029128-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Watanabe-Takahashi M, Tamada M, Senda M, Hibino M, Shimizu E, Okuta A, Miyazawa A, Senda T, and Nishikawa K.	４．巻 10
２．論文標題 Identification of a peptide motif that potently inhibits two functionally distinct subunits of Shiga toxin	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Communications Biology	６．最初と最後の頁 538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02068-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Sato W, Watanabe-Takahashi M, Hamabata T, Furukawa K, Funamoto S, and Nishikawa K.	４．巻 557
２．論文標題 A nontoxigenic form of Shiga toxin 2 suppresses the production of amyloid beta by altering the intracellular transport of amyloid precursor protein through its receptor-binding B-subunit	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	６．最初と最後の頁 247-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Miho Watanabe-Takahashi, Jun Motoyama, Jyoji Yamate, Shinji Yamasaki and Kiyotaka Nishikawa
２．発表標題 Exosome-associated Shiga toxin 2 is released from cells and causes severe toxicity in mice.
３．学会等名 VTEC2018（国際学会）
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関