

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390104

研究課題名(和文)腸管出血性大腸菌が産生するSubABトキシンの病原性増強作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenic reinforcement action of enterohemorrhagic Escherichia coli produced SubAB

研究代表者

野田 公俊(Noda, Masatoshi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60164703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：non-O157型腸管出血性大腸菌(EHEC)が主に産生する毒素SubABは、小胞体中に存在するシャペロン蛋白質BiPを分解し、ERにストレスを起こし、細胞障害、致死を誘導する。本研究期間において以下の点を明らかにした。1) SubABのマクロファージに対し、NF- $\kappa$ Bの核内移行、あるいはNF- $\kappa$ Bの結合活性を抑制することで、NO産生抑制効果を示した。2) SubABは、lipid-raft、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange チャンネル、アクチン依存的に細胞内に侵入し、コレステロールリッチな膜に覆われて細胞内を移動していた。3) 新たな宿主応答として、ストレスグラニュール形成を、PKC依存的に誘導する。

研究成果の概要(英文)：Subtilase cytotoxin (SubAB) is mainly produced by locus of enterocyte effacement (LEE) -negative strains of Shiga-toxigenic Escherichia coli (STEC). SubAB cleaves an endoplasmic reticulum (ER) chaperone, BiP/Grp78, leading to induction of ER stress. This stress causes activation of ER stress sensor proteins and induction of apoptosis. Here we showed that 1) SubAB enters the cells via lipid rafts- and an actin-dependent pathways 2) in mouse macrophages, that SubAB inhibited LPS-stimulated NO production through inhibition of NF- $\kappa$ B nuclear translocation and iNOS expression 3) SubAB-induced SG formation is regulated by the PERK/DAP1 signaling pathway, which may be modulated by PKCdelta/PKD1.

研究分野：細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 SubAB 小胞体ストレス 一酸化窒素 細胞死 ストレスグラニュール

## 1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌(EHEC)が産生する新たな毒素 Subtilase cytotoxin (SubAB)は、小胞体中に存在するシャペロン蛋白質 BiP を分解し、その活性を阻害することによって ER にストレスを起し、細胞障害性を誘導すると考えられる。しかし、その詳細な細胞障害・致死機構、他の宿主応答機構に関しての知見は不明な点が多く残っている。

## 2. 研究の目的

腸管出血性大腸菌(EHEC)の主要な病原因子は志賀毒素(Shiga-toxin, Stx)であるが、Stx の産生量や EHEC の宿主に対する病原性を増強させる因子を解明したい。我々は EHEC の新規毒素である Subtilase cytotoxin(SubAB)の作用機構を分子レベルで詳しく報告して来た。この SubAB は細胞傷害活性を有するが、さらに標的細胞のオートファジーの誘導阻害と食細胞の NO の産生を抑制する事を発見した。これらは EHEC の感染率上昇に寄与する可能性がある。また、NO は Stx の産生を抑制するが、NO の減少は Stx の産生量増加を起こす可能性がある。さらに高病原性の EHEC には NO を分解する NO reductase gene を有するものがあるが、通常の EHEC はこの遺伝子をもたないので、SubAB の NO 産生抑制作用が代替的にこの役割を担う可能性がある。SubAB のこれらの病原性増強活性の働きを解明し、高病原性 EHEC の検出や予防・治療等の開発に役立てたい。

## 3. 研究の方法

### (1) リコンビナント SubAB の発現と精製

大腸菌で発現させた His-Tag SubAB と、酵素活性中心アミノ酸を置換した変異体 mSubA(S272A)B を Ni-NTA カラム により精製して実験に用いた。

### (2) siRNA の遺伝子導入

HeLa 細胞を用い、種々の siRNA とコントロール (NC) siRNA を Lipofectamine

RNAiMax (Invitrogen) により遺伝子導入し、48 時間後、標的蛋白質の発現を Western blotting により確認した。

### (3) 免疫染色

HeLa 細胞を SubAB (0.2 mg/ml) で一定時間処理した後、4%PFA で固定する。ヤギ血清でブロッキングした後、各種抗体で反応させる。次に、蛍光標識した 2 次抗体と反応させた後、共焦点顕微鏡観察により解析した。

### (4) 免疫沈降法

構造変化した Bax/Bak を免疫沈降法により検出する。HeLa 細胞を SubAB あるいは mSubAB で一定時間処理した後、細胞を回収した。細胞を 2% CHAPS を含む細胞可溶性溶液で処理し、遠心後、上清を回収した。この上清に抗 Bax 抗体 (clone3, BD)、あるいは抗 Bak 抗体 (Ab-2, Calbiochem) を添加し、構造変化した Bax/Bak の免疫沈降を行った。

### (5) ルシフェラーゼアッセイ

転写因子 NF B の活性化をモニターするリポーターとして、ルシフェラーゼをコードする promoter 配列の上流に NF B の結合配列を付加したコンストラクトを作製し、マクロファージに遺伝子導入した。LPS と SubAB 処理した後、ルミノメーターで NF B の活性化を測定した。

### (6) ウェスタンブロット法

種々の細胞を阻害剤、活性化剤存在下、SubAB で処理した。1×SDS サンプルバッファーで可溶化し、熱変性した後、SDS-PAGE した。PVDF 膜に転写し、5%スキムミルクを含むバッファーでブロッキングした。Immunoshot バッファー中で、一次抗体と反応させた。洗浄後、二次抗体と反応させ、ECL で検出した。

### (7) subAB 遺伝子破壊 STEC 株の作成

STEC0113:H21 株の subAB 遺伝子を破壊するため、kanamycin 耐性遺伝子を挿入した。

#### 4. 研究成果

##### (1) SubAB の細胞内侵入機構の解析

これまで SubAB はクラスリンを介して細胞内侵入することがサル腎細胞由来 Vero 細胞で示されていた。今回、HeLa 細胞を用い、種々の阻害剤、遺伝子抑制により評価した。クラスリン、カベオリン、ダイナミンのノックダウンでは SubAB の細胞内への取り込みは抑制されず、クラスリンの阻害剤、ダイナミンの阻害剤を用いた場合も同様の結果を得た。mbCD, filipin III による Lipid-raft の阻害は顕著に SubAB の取り込みを抑制していた。つまり、SubAB は lipid-raft を介して細胞内に侵入していると推察された。

更に、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange channel 阻害剤 EIPA、アクチン重合阻害剤 cytochalasin D で SubAB の取り込みは抑制された。又、取り込まれた SubAB は TritonX-100 不溶性ベシクル、つまり、コレステロールリッチな膜で覆われていることが判った。以上の結果は、SubAB が比較的簡単に、多様な組織に取り込まれ、毒性を発揮しやすいことを裏付けている。

##### (2) SubAB のマクロファージに対する NO 産生抑制効果

SubAB が LPS 刺激によるマクロファージからの NO 産生を阻害することを見いだしたため、この阻害機構を解析した。

その作用機序として、SubAB は LPS 刺激による NF-κB の核内移行、あるいは NF-κB の結合活性を抑制することで、iNOS プロモーターの転写開始点から 100 bp 上流域への NF-κB の結合を阻害すると考えられた。iNOS プロモーターを用いたレポーターアッセイの結果、転写開始点から 100 bp 上流域を欠失させた変異体では転写活性がほとんど認められず、この領域は iNOS 発現に特に重要であることが示唆され、SubAB が iNOS 発現を強力に抑制する原因の一つと考えられた。

また、BiP 切断活性をもたない変異体 SubAB (mSubAB) が NO 産生および NF-κB の結合活性を抑制しないことから、SubAB は BiP を切断し、ER ストレスを与えることで NO 産生を抑制していると推察された。更に、大腸菌内で発現する SubAB が大腸菌の生存に及ぼす影響を SubAB あるいは mSubAB 発現ベクターを導入した BL21 (BL21/WT、BL21/MT) を用いて生存率を調べた所、BL21/MT より BL21/WT の生存率が有意に上昇した。つまり、マクロファージから産生される NO は大腸菌を殺菌する分子であり、NO 産生を抑制する SubAB は大腸菌のマクロファージ内での生存に貢献すると考えられた。

##### (3) SubAB によるストレスグラニュール形成機構

新たな宿主応答反応として SubAB がストレスグラニュー (SG) 形成を誘導することを見出した。SubAB は SG を誘導する初めての細菌毒素である。subAB 遺伝子をノックアウトした STEC O113:H21 株の培養上清を添加した細胞では、野生株の培養上清により誘導される SG が観察されないことから、SubAB が SG 形成に必須であることが示唆された。また、PKC, PKC family 蛋白質の発現抑制実験により、PKCdelta と PKD1 が SubAB の SG 形成に関与していることが明らかとなった。また、SubAB のアポトーシス誘導に関与する Death-associated Protein 1 (DAP1) の発現抑制においても SG 形成が阻害された。この SG 形成はアルツハイマー病等の神経系疾患に関与することが知られている。SubAB による SG 形成が EHEC 感染症において、どの組織で観察されるか解析することで、病態形成におけるその役割を明らかにすることができると期待される。

##### (4) 一酸化窒素 NO の EHEC の志賀毒素産生に対する影響

EHEC が産生する志賀毒素 1 (Stx1) と志賀毒素 2 (Stx2) は、共に NO によって産生量の

亢進を認めた。更に、EHEC 0157 の持つ NO 還元酵素のタイプ (完全型、欠損型) が、NO による EHEC からの志賀毒素の産生制御に関与していることを明らかにした。また、完全型 NO 還元酵素遺伝子を保持する EHEC 0157 の進化の過程をその配列の有無から明らかにした。以上の結果は、宿主防御因子である NO に対して、どのように EHEC 0157 が対抗し、回避或いは攻撃するのか興味深い知見を得ることができた。

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 20 件)

1. 八尋錦之助, Shelley Starck. 「5' 非翻訳領域からの翻訳が統合的ストレス応答に適應する」 *Science: Japanese Scientists in Science* 2016. 19,19 (2017). 査読無
2. Ichimura, K., Shimizu, T., Matsumoto, A., Hirai, S., Yokoyama, E., Takeuchi, H., Yahiro, K., and Noda, M. (2017). Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Microbiologyopen*. e461.1-17. DOI:10.1002/mbo3.461. 査読有
3. Tsutsuki, H., Yahiro, K., Ogura, K., Ichimura, K., Iyoda, S., Ohnishi, M., Nagasawa, S., Seto, K., Moss, J., and Noda, M. (2016). Subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxicogenic *Escherichia coli* induces stress granule formation. *Cell Microbiol.* 18,1024-40. 査読有 DOI: 10.1111/cmi.12565
4. Starck, S. R., Tsai, J. C., Chen, K., Shodiya, M., Wang, L., Yahiro, K., Martins-Green, M., Shastri, N., and Walter, P. (2016). Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science* **351**(6272), aad3867, 査読有 DOI: 10.1126/science.aad3867.
5. Shimizu, T., Ichimura, K., and Noda, M. (2016). The surface sensor NlpE of enterohemorrhagic *Escherichia coli* contributes to regulation of the type III secretion system and flagella by the Cpx response to adhesion. *Infect. Immun.* 84, 537-549. 査読有 DOI:10.1128/IAI.00881-15
6. 八尋錦之助. 2016. 「腸管出血性大腸菌感染の現状と病原性」化学療法の領域 4月号.32(4):70-76. 査読無
7. Shimizu, T., Hirai, S., Yokoyama, E., Ichimura, K., and Noda, M. 2015. An evolutionary analysis of nitric oxide reductase gene *norV* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Infect. Genet. Evol.* 33, 176-181. 査読有 DOI:10.1016/j.meegid.2015.04.027
8. 清水 健、藤永由佳子、高屋明子、芦田 浩、児玉年央、畠山昌則「細菌エフェクター・細菌毒素の分子標的と疾病脆弱性」日本細菌学雑誌、2015, 70 : 319-328. 査読無
9. Yahiro, K., Tsutsuki, H., Ogura, K., Nagasawa, S., Moss, J., and Noda, M. (2014). DAP1, a Negative Regulator of Autophagy, Controls SubAB-Mediated Apoptosis and Autophagy. *Infection and Immunity* **82**, 4899-4908, 査読有 DOI: 10.1128/iai.02213-14.
10. Nagasawa, S., Ogura, K., Tsutsuki, H., Saitoh, H., Moss, J., Iwase, H., Noda, M., and Yahiro, K. (2014). Uptake of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*

- SubAB by HeLa cells requires an actin-and lipid raft-dependent pathway. Cellular Microbiology 16, 1582-1601, 査読有 DOI: 10.1111/cmi.12315.
11. 清水 健、野田公俊「病原性大腸菌による感染症 -腸管出血性大腸菌を中心に-」千葉医学雑誌、2014, 90, 47-52. 査読無
  12. 清水 健「腸管出血性大腸菌の重症化メカニズム：病原性と志賀毒素」感染症内科、2014, 2(4), 377-384. 査読無
  13. 清水 健「志賀毒素 2 (Stx2)の病原性発現機構」感染炎症免疫、2014, 44, 67-69. 査読無
  14. Arimitsu, H., Sasaki, K., Shimizu, T., Tsukamoto, K., Shimizu., Tsuji, T. (2012) Large scale preparation of Shiga toxin 2 in *Escherichia coli* for toxoid vaccine antigen production. Microbiol. Immunol. 57, 38-45. 査読有 DOI: 10.1111/j.1348-0421.2012.12004.x
  15. 清水 健、野田公俊「腸管出血性大腸菌の重症化要因」感染炎症免疫、2013, 43, 74-7. 査読無
  16. Tsutsuki, H., Yahiro, K., Suzuki, K., Suto, A., Ogura, K., Nagasawa, S., Ihara, H., Shimizu, T., Nakajima, H., J. Moss, J., and Noda, M. (2012) Subtilase Cytotoxin Enhances *Escherichia coli* Survival in Macrophages by Suppression of Nitric Oxide Production through the Inhibition of NF-kappa B Activation. Infect. Immun. 80: 3939-3951. 査読有 DOI: 10.1128/IAI.00581-12.
  17. Shimizu, T., Tsutsuki, H., Matsumoto, A., Nakaya, H., and Noda, M. (2012) The nitric oxide reductase of enterohemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. Mol. Microbiol. 85, 492-512. 査読有 DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08122.x.
  18. 八尋錦之助. 2012. 「腸管出血性大腸菌の病原性発現機構」化学療法の領域 6月号.28(6):45-52. 査読無
  19. Neri, P., Tokoro, S., Sugiyama, T., Umeda, K., Shimizu, T., Tsuji, T., Y. Kodama, T., Mori, H. (2012) Recombinant Shiga toxin B subunit can induce neutralizing immunoglobulin Y antibody. Biol. Pharm. Bull. 35: 917-923. 査読有
  20. 清水 健、野田公俊「腸管出血性大腸菌による食中毒重症化メカニズム」2012,日本医事新報 4614,98-99. 査読無
- 〔学会発表〕（計 16 件）
1. Shimizu, T., Hirai, S., Yokoyama, E., Kimitoshi Ichimura, K., Noda, M. 「An evolutionary analysis of a novel virulence gene *norV* that encodes nitric oxide reductase in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157」50th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel 2016年1月13-15日 (Bethesda, USA)
  2. Yahiro, K., Tsutsuki, H., Ogura, K., S. Iyoda, S., Ichimura, K., Shimizu, T., M. Ohnishi, M., Seto, K., Moss, J., and Noda, M. 「Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB-induced ER stress causes stress granule formation in mammalian cells」50th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel 2016年1月13-15日 (Bethesda, USA)
  3. Yahiro, K. 「Effect of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*-produced Subtilase cytotoxin (SubAB) on host cells」Invitation meeting 2016年1月14日 (NIH/NHLBI, Bethesda, USA)
  4. 清水 健、平井 晋一郎、横山 栄二、市村

- 公敏、野田公俊「腸管出血性大腸菌 0157 が保持する新規病原因子一酸化窒素還元酵素遺伝子 *norV* の進化的解析」第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23-25 日（大阪府大阪市、大阪国際交流センター）
5. 津々木博康、Thianli Zhang, 小野勝彦、八尋錦之助、澤智裕、野田公俊「腸管出血性大腸菌 Subtilase cytotoxin によるインフラマソーム抑制機構の解析」第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23-25 日（大阪府大阪市、大阪国際交流センター）
  6. 市村公敏、清水健、八尋錦之助、竹内裕紀、野田公俊「一酸化窒素による腸管出血性大腸菌の志賀毒素産生亢進機構の解析」第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23-25 日（大阪府大阪市、大阪国際交流センター）
  7. 八尋錦之助、野田公俊「腸管出血性大腸菌の産生する SubAB の細胞障害機構の解明」第 61 回トキシシンポジウム 2014 年 9 月 3-5 日（徳島県鳴門市、ルネッサンスリゾートナルト）
  8. 永澤明佳、八尋錦之助、齋藤久子、岩瀬博太郎、野田公俊「腸管出血性大腸菌の産生する Subtilase cytotoxin (SubAB) はアクチン及び脂質ラフト依存的に細胞内に取り込まれる」(若手奨励賞受賞) 第 61 回トキシシンポジウム 2014 年 9 月 3-5 日（徳島県鳴門市、ルネッサンスリゾートナルト）
  9. 永澤明佳、八尋錦之助、齋藤久子、岩瀬博太郎、野田公俊「腸管出血性大腸菌の産生する Subtilase cytotoxin の細胞侵入機構の解析」(若手奨励賞受賞) 第 97 回日本細菌学会関東支部総会 2014 年 10 月 30-31 日（東京都文京区、東京ドームホテル）
  10. 八尋錦之助、永澤明佳、齋藤久子、岩瀬博太郎、野田公俊「Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB enters via lipid-raft- and actin-dependent endocytosis in HeLa cells」49th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel 2015 年 1 月 14-16 日（Florida, USA）
  11. 野田公俊「病原細菌の AB5 型トキシンの作用機構等に関する研究」第 23 回学会賞受賞者特別講演会 2014 年 1 月 29 日（東京都港区、北里大学）
  12. 八尋錦之助、野田公俊「Inhibition of autophagy by SubAB is regulated by PERK-dependent pathway in HeLa cells」第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26-28 日（東京都江戸川区、タワーホール船堀）
  13. 永澤明佳、八尋錦之助、小倉康平、津々木博康、野田公俊「Characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB uptake pathway in HeLa cells」第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26-28 日（東京都江戸川区、タワーホール船堀）
  14. 清水健「一酸化窒素還元酵素：腸管出血性大腸菌の志賀毒素産生に影響を与える新規病原因子」第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26-28 日（東京都江戸川区、タワーホール船堀）
  15. 八尋錦之助、津々木博康、野田公俊「腸管出血性大腸菌の産生する SubAB の PERK を介したアポトーシス制御機構」第 60 回毒素シンポジウム 2013 年 7 月 17-19 日（兵庫県宍粟市、楓香荘）
  16. Shimizu, T., Kimitoshi Ichimura, K., Noda, M. 「The surface sensor NlpE of enterohemorrhagic *Escherichia coli* contributes to Regulation of the Type III Secretion System and Flagella by the Cpx Response to Adhesion」48th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel 2014 年 2 月 11-13 日（Dhaka, Bangladesh）
- 〔図書〕（計 1 件）
1. Yahiro, K., Moss, J., and Noda, M. (2013) Handbook of Proteolytic Enzymes, 3<sup>rd</sup> Edition [Cytotoxin SubAB (Chapter 694)] 2013, 3155-61
- 〔その他〕  
ホームページ  
(<http://www.chiba-bacteria.jp/>)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
野田 公俊 (NODA MASATOSHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：60164703
  - (2) 研究分担者  
清水 健 (SHIMIZU TAKESHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：70312840
- 八尋 錦之助 (YAHIRO KINOSUKE)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授  
研究者番号：80345024
- 津々木 博康 (TSUTSUKI HIROYASU)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
(現：熊本大学・大学院生命科学研究部・助教) 研究者番号：40586608