

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390124

研究課題名（和文） EHECのSubABの標的臓器の解明とその迅速検出法

研究課題名（英文） Studies on the SubAB toxin, its target organs, and its quick identification.

研究代表者

氏名（ローマ字）：野田 公俊（NODA MASATOSHI）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60164703

研究成果の概要：

蛍光色素で標識した精製SubABを作製した。この毒素の標的臓器は上部消化管であると推察された。

臨床分離株大腸菌におけるSubAB産生株の出現頻度について解析した。使用したEHEC29株中、全株がStxを産生しており、2株だけがsubAB 遺伝子を保有し、かつSubAB毒素を産生してた。

SubAB産生株を効率良く迅速に検出するためのキット作製には、SubAB毒素の特異的酵素活性による検出法が有効と結論された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：SubAB、EHEC、Stx、AB成分毒素ファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

O157:H7 などの腸管出血性大腸菌(EHEC)は、今日でも我国やアメリカ合衆国など多くの国や地域において流行を繰り返しており、社会問題になっている。この菌は、Shiga-like toxin(Stx) を産生する事から Shiga toxinogenic *Escherichia coli* (STEC)とも呼ばれている。STEC は鮮血便を特徴とする出血性の下痢などの食中毒症状を起こす以外に、溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などの重篤な症状を患者に引き起こす事例がある。STEC による出血性下痢は、この菌が産生する Stx によって起こる事が明らかにされている。HUS や脳症も Stx によって起こるものと推察されているが、Stx を産生しない EHEC の感染を受けて、HUS や脳症を発症した事例の報告もある。2004 年にオーストラリアのグループが Stx とは異なる新しい細胞障害毒素 (SubAB) が STEC に存在することを報告した (Paton AW, et al. J Exp Med, 200, 35-46, 2004)。我々は EHEC の臨床分離株の中に、確かにこの毒素遺伝子をもつものが存在する事を確認し、その遺伝子のクローニングを行った。これを大腸菌に発現させてリコンビナント毒素を精製することができた。そして、この毒素の受容体はインテグリン 2 1 であることを発見し報告した (Yahiro k. et al., Mol Microbiol, 62:480-490, 2006)。この毒素は、志賀赤痢菌や STEC が産生する Stx、さらにはコレラ菌が産生するコレラ毒素 (CT) と同様に、1 個の A サブユニットと 5 個の B サブユニットから成る AB 成分毒素ファミリーに属するが、Stx や CT とはまったく異なる受容体を認識していた。その毒性は Stx と同様にアフリカミドリザルの腎臓由来の Vero 細胞に対する強い細胞障害活性を有しており、最終的に細胞死を引き起こした。これらの知見は、この毒素が Stx 非産生 EHEC

の感染において HUS 等を引き起こす可能性を強く示唆しており、その病原性を解明するという当研究プロジェクトの着想に至った。

私たちの研究は SubAB という新しい毒素に着目して研究を行う点が特色で、生体内の標的臓器を明らかにし、また、SubAB に対する阻害剤を得る事で、EHEC による感染症に新しい対処方法を提供する可能性を検討する。さらに、SubAB 産生株を効率良く迅速に検出するキット作製を目指しており、学問的にも臨床的にもその意義は大きいと思われる。

## 2. 研究の目的

三つのことを明らかにしたい。第一は、精製 SubAB をマウスなどの実験動物に投与し、生体内で毒素の動向をリアルタイムに追跡し、この毒素の標的臓器の特定を行う。すでに私たちは蛍光色素で標識した精製 Stx を用いて、マウス体内での Stx の動向を経時的に解析し報告した経験があるので、今回も蛍光色素で標識した SubAB を作製して用いる。第二は、SubAB の毒性を阻害する物質のスクリーニングを行い、その阻害物質を手に入れる。すでに私たちは AB 成分毒素ファミリーに属する Stx と CT に対して無毒化剤を発見し、動物実験によってその阻害効果を実証し、その阻害機構を報告して来た (Oi H. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 99:3042-3046, 2002, Morinaga N. et al. J Biol Chem, 280:23303-23309, 2005) ので、スクリーニングに供する多数の試料を有している。第三は、臨床分離株の EHEC、STEC の何%がこの SubAB の遺伝子を有するのか、またその発現率も明らかにしたい。そして、SubAB の迅速検出キットを作製し、感染症対策の一助にしたい。

## 3. 研究の方法

(1) SubABの精製と毒素活性の測定：

我々はすでにSubABの遺伝子のクローニングを行い、これを大腸菌に発現させてリコンビナント毒素を精製することに成功しているため、実験に供する高純度SubABは、この方法で作製した。この毒素の精製を効率良く容易に行う為にHis-tagを付加し、Ni-NTAアガロースカラムを用いて精製する方法である。精製したSubABの純度をSDS-電気泳動によって確認し、実験に供した。当精製方法は極めて効率良く高純度のSubABを得る事ができた。

精製毒素の細胞障害活性は、扱いが比較的容易であり、またすでに高い感受性を確認したVero細胞を用いて行った。また、我々はすでに当毒素が蛋白合成阻害活性をもつ事と、マイクロゾーム分画中の78kDaの蛋白質に作用して、45kDaと31kDaに分解する事を見つけて、報告したので、これらを用いてより感受性の高い毒性検出系を確立する。我々の論文内容と極めて似た報告があり、SubABが分解するマイクロゾーム分画の78kDaの蛋白質はシャペロン蛋白Bipであることがわかった(Paton AW, et al. Nature, 443, 548-552, 2006)。我々の78kDa蛋白質もシャペロン蛋白Bipであることをすでに確認した。

(2) 蛍光標識SubABの作製：

精製SubABを蛍光色素で標識し、生体内での動向を検知して解析する為に、生体が発する自己発光(< 600nm)を越える高い蛍光強度を有する色素を選択した。今回は800nm程度の高い蛍光強度を有する色素を数種類入手する事が可能となったので、これらの蛍光色素でSubABを標識した。蛍光色素で標識されたSubABが、本来の毒性を保持しているか否かの確認は、Vero細胞を

用いた細胞障害活性測定系を用いた。さらに、蛋白合成阻害活性の測定とシャペロン蛋白Bipに対する蛋白分解活性の測定も併せて行った。

(3) 蛍光標識SubABのマウス生体内動向の解析：

800nm程度の高い蛍光強度を有する蛍光色素で標識したSubABでも、93%以上の高い毒性を保持していたので、これを用いた。また、今回購入したBERTHOLD社の超高感度蛍光蛍光イメージングシステムNightOWL LB981を用いて、生体内の蛍光標識SubABの動向を追跡し解析し、毒素の標的臓器の特定を行った。標的臓器と思われる全ての臓器を摘出して、その病理的变化を解析した。

(4) 臨床分離株のsubAB遺伝子の保有率と発現率の解析：

臨床分離株の病原大腸菌、特にEHEC、STECのうち何%がこのSubABの遺伝子を保有するのかをPCRにより解析した。さらに、SubABの遺伝子を保有する菌株については、その発現率をSubABの抗体を用いたELISA、蛋白合成阻害活性の測定およびシャペロン蛋白Bipに対する蛋白分解活性の測定も併せて行い明らかにした。

(5) SubABの迅速検出キットの作製：

SubAB産生株に対しては、臨床での迅速な対応が要求される場合が想定されるので、SubABの遺伝子を有する菌株の迅速検出法と、SubAB蛋白の迅速検出法の確立をめざした。前者はPCRにより可能である事をすでに確認している。後者は毒素蛋白の抗体を用いる方法と、我々がすでに報告したSubABの受容体であるインテグリン 21を用いた方法、さらにはSubABの特異的

な酵素活性に着目した方法を開発し、その中で最も信頼度の高い方法の確立をめざした。

(6) SubABの阻害剤の検索及びその *in vivo*での阻害効果の解析：

SubABのVero細胞に対する毒性を指標にして、その無毒化剤のスクリーニングを行った。すでに私たちはStxとCTに対して無毒化剤を発見し、動物実験によってその阻害効果を実証し、報告を行って来たので、それらの手技を用いた。もし、無毒化剤を入手できたら、その阻害メカニズムも明らかにする。また、蛍光標識SubABとその無毒化剤をマウスに同時投与した際の生体内動向を蛍光で解析し、毒素の生体内制御の可能性を探る。

#### 4. 研究成果

(1) SubAB の精製：

SubAB の精製は、SubAB 発現用プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3)を培養後、得られた菌体破碎上清から Ni-NTA アガロースカラムを用いて精製した。精製した SubAB は、SDS-PAGE により純度を確認した。毒素活性は、Vero 細胞に対する細胞障害活性を指標にして確認した。0.01ng/ml ~ 10 µg/ml の SubAB を作用させた結果、24 時間で 0.1 µg/ml 以上を加えた Vero 細胞において空胞化が観察され、0.1ng/ml 以上 48 時間で細胞死が観察された。次に致死毒性を確認するために、マウス (ddY 5w 齢) に腹腔内投与したところ、5 µg/body 以上で致死性であった。死亡したマウスの剖検から、腹水の貯留・上部消化管に出血や拡張所見が確認された。

(2) 蛍光標識 SubAB の作製：

蛍光標識 SubAB の作製は、750nm の蛍光強

度を有する蛍光色素 (Alexa Fluor750) を用いて行った。蛍光標識 SubAB の毒素活性は、Vero 細胞に対する細胞障害活性及びマウス (ddY 5w 齢) に対する致死活性を測定して行った。蛍光標識 SubAB の細胞障害活性は、未標識 SubAB の毒性とほぼ同程度であり、24 時間時点で 0.1 µg/ml 以上の濃度で Vero 細胞に対する空胞化がみられた。又 0.1ng/ml 以上 48 時間で細胞死が観察された。マウスにおける致死活性でも、蛍光標識 SubAB 10 µg/body 腹腔内投与で致死性であった。

(3) SubABの標的臓器の特定：

蛍光標識SubABのマウス生体内動向は、BERTHOLD社製NightOWL LB981を用いて行った。マウスの自家蛍光を極力除去するための条件作りを進めた結果、Research Diets 社製 D10001AIN-76A Rodent dietの餌を使用すると自家蛍光を減少させることができた。毒素の標的臓器を特定する為に、この餌を用いて飼育したマウス (ddY 5w 齢) の腹腔に蛍光標識したSubABを投与したところ、全例で上部消化管に出血が観察された。この毒素の標的臓器は上部消化管であると推察された。

(4) 臨床分離株の *subAB* 遺伝子の保有率と発現率の解析：

臨床分離株大腸菌における *subAB* 遺伝子の保有率およびSubAB産生株の出現頻度について解析した。実験方法は、次の3つの手法を用いた。 *subAB* 遺伝子のPCRによる検出法。 SubAB毒素の抗体による検出法。 SubAB毒素のシャペロン蛋白 Bipに対する分解酵素活性による検出法。使用した臨床分離株のEHEC29株中、全株がStxを産生していた。この中で、2株だけ

がSubABの遺伝子を保有しており、2株とも毒素を産生していたので、遺伝子の保有率と毒素の発現率はStxを産生しているEHECの約7%であった。他のEHEC以外の臨床分離株12株(ETEC、CTEC、EAEC、EPEC)ではStx及びSubAB毒素産生は観察されなかった。

(5) SubABの阻害剤の検索：

SubABの毒性を阻害する物質のスクリーニングをVero細胞を用いて行った。SubAB毒素と同じAB5型のStxやコレラ毒素に対して強い阻害活性を有するポリフェノール系のホップ由来のHPやリンゴ由来のAPは、SubABには全く阻害効果を示さなかった。この結果は極めて興味深く、SubABの特異的な性状を示す一因かも知れない。現在、阻害物質のスクリーニングを継続中である。

(6) SubABの迅速検出キットの作製：

SubAB産生性EHECを効率良く迅速に検出するためのキット作製には、SubAB毒素の特異的酵素活性であるシャペロン蛋白Bipに対する分解酵素活性に着目した検出法が最も有効であると結論された。

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 4件)

Hanashima, T., M. Miyake, K. Yahiro, Y. Iwamaru, A. Ando, N. Morinaga, and M. Noda. Effect of Gb3 in lipid rafts in resistance to Shiga-like toxin of mutant Vero cells. *Microb Pathog* 45:124-133. 2008. 査読有  
Morinaga, N., K. Yahiro, G. Matsuura, J. Moss, and M. Noda. Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein

synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1. *Cell Microbiol* 10:921-929. 2008. 査読有  
Choi O, Yahiro K, Morinaga N, Miyazaki M, Noda M. Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of Staphylococcal alpha-toxin. *Microb Pathog* 42:215-224. 2007. 査読有  
Morinaga N, Yahiro K, Matsuura G, et al. (省略4名、7番目に掲載) Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75:488-496. 2007. 査読有

[学会発表](計 5件)

盛永直子・八尋錦之助・松浦玄・野田公俊. STECの産生する subtilase cytotoxin による Vero 細胞蛋白合成阻害機構と細胞周期への影響. 日本細菌学会 2009.3.12 愛知県(名古屋国際会議場)  
Naoko Moringa, Kinnosuke Yahiro, Joel Moss, Masatoshi Noda. Subtilase cytotoxin induced G1 arrest of Vero cells through degradation of cyclon D1. Cholera and other bacterial enteric infections 2008.11.19 福岡県(九州大学医学部百年講堂)  
盛永直子・八尋錦之助・野田公俊. STECの産生する subtilase cytotoxin (SubAB)による Vero 細胞の G1 アレスト誘導機構. 毒素シンポジウム 2008.7.3 山梨県(マール山中湖)  
盛永直子、八尋錦之助、松浦玄、野田公俊. STECの産生する新規 AB サブユニット毒素の性状. 毒素シンポジウム 2007.7.6 山梨県(八ヶ岳ロイヤルホテル)  
盛永直子、八尋錦之助、松浦玄、野田公俊. STECの産生する新規AB5サブユニット毒素 SubAb の BiP 分解活性. 日本細菌学会 2007.3.26 大阪府(アジア太平洋トレードセンター)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

なし

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

盛永 直子 (MORINAGA NAKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：20092108

桑原 聡 (KUWABARA SATOSHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：70282481

清水 健 (SHIMIZU TAKESHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：70312840

森 雅裕 (MORI MASAHIRO)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：70345023

(3)連携研究者

盛永 直子 (MORINAGA NAKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：20092108

桑原 聡 (KUWABARA SATOSHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：70282481

清水 健 (SHIMIZU TAKESHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：70312840

森 雅裕 (MORI MASAHIRO)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：70345023