

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K08823  
研究課題名(和文)腸管出血性大腸菌毒素SubABのレドックス活性化機構とその感染病態制御法の解明  
  
研究課題名(英文)Elucidation of the redox activation mechanism of enterohemorrhagic Escherichia coli toxin SubAB and the infection control  
  
研究代表者  
津々木 博康(Tsutsuki, Hiroyasu)  
  
熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師  
  
研究者番号：40586608  
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)：Subtilase cytotoxin(SubAB)は、腸管出血性大腸菌が産生する毒素であり、宿主小胞体シャペロン蛋白質であるBiPを切断することで小胞体ストレス性の細胞毒性を示す。本研究では、SubABの毒性発現に関わる宿主の酸化還元(レドックス)調節因子の探索とその機序を調べ、複数の宿主レドックス因子がSubABのBiP切断に関わることを見出した。またそれらの因子を標的としたSubABの制御法を調べ、生体防御因子である一酸化窒素が阻害効果を示すことが分かった。本研究は、SubABが小胞体に到達しBiPを切断する過程を阻害できる新たなレドックス制御戦略の開発に繋がることが期待される。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

日本でSubAB産生EHECによる集団食中毒が起こった場合、重症化を防ぐ対策は整っていない。SubABの毒性発現機序、Stxとの相互作用や合併症(溶血性尿毒症症候群)との関連、感染病態におけるSubABの役割は不明な点が多い。一般に、EHEC感染症では、抗生剤を用いると溶菌し、菌体から大量の毒素が漏出し病態が悪化することが懸念されるため、その使用は推奨されていない。解決策として、抗生剤と併用できる毒素の阻害剤の開発が有効であると考えられる。本研究はSubABを阻害する薬剤の開発という革新的な治療戦略の構築に繋がる点で学術的および社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Subtilase cytotoxin(SubAB) is a toxin produced by enterohemorrhagic E. coli that exhibits endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity by cleaving the host endoplasmic reticulum chaperone protein BiP. In this study, we investigated the host redox regulators involved in SubAB toxicity and their mechanisms, and found that several host redox factors are involved in BiP cleavage by SubAB. Furthermore, by targeting these factors, he explored the inhibitory mechanism of SubAB, and found that nitric oxide, a host defense factor, exhibited inhibitory effects. This work is expected to lead to the development of new redox control strategies that can inhibit the process by which SubAB reaches the endoplasmic reticulum and cleaves BiP.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌毒素 腸管出血性大腸菌 レドックス 小胞体ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 腸管出血性大腸菌(EHEC)と病原因子について

EHEC の主要な病原因子は志賀毒素 (Stx) であるが、欧州の O104 株食中毒事例 (2011 年) では Stx 産生大腸菌がさらに定着因子をもつことで病原性が高くなったと考えられている。Stx に加えて第二、第三の病原因子を獲得した高病原性の EHEC を起因菌とする食中毒が今後日本でも起こりうる。そのような病原因子、特に毒素の同定と機能解析は本感染症における予防と治療のために急務とされる。

#### (2) Subtilase cytotoxin (SubAB) とレドックス調節の関与について

SubAB は、オーストラリアにおいて溶血性尿毒症症候群 (HUS) を伴う集団食中毒を引き起こした EHEC O113 株が産生する新規毒素として同定された (1)。SubAB は、一つの A サブユニットと 5 つの B サブユニットから構成される AB<sub>5</sub> 型毒素である。SubAB は宿主細胞に侵入すると逆行性細胞輸送により小胞体 (ER) に移行する。A サブユニットはセリンプロテアーゼ活性をもち、ER のシャペロン蛋白質 BiP を切断することで宿主細胞に ER ストレス性の細胞死を誘導する (2)。SubAB はマウスに対して腸管出血を伴う致死を誘導する (3) ことから、EHEC の重要な病原因子と考えられる。

国立感染症研究所の病原微生物検出情報 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>) によると、日本でも 2009 年より EHEC O113 株が検出されており、その病原因子として SubAB が重要視されている。他にも O29、O183、O174、O74 など SubAB を産生する EHEC が臨床患者から検出されている (未発表データ)。SubAB の A サブユニットには一対のジスルフィド結合 (S-S 結合) が形成されており、チオール基を介したレドックス調節 (S-S 結合の還元による SH 化など) による活性化が示唆される。しかしこのような SubAB の活性調節の報告はこれまでにない。応募者は siRNA を用いた予備実験から、ジスルフィド結合の転移酵素である Protein disulfide isomerase (PDI) が SubAB を活性化し、BiP の切断を誘導する宿主レドックス調節分子であることを見出した (Tsutsuki et al., BBRC., 2020)。一方、研究代表者らはこれまで SubAB の細胞致死活性を明らかにするなかで、SubAB がマクロファージにおいてリポ多糖 (LPS) によって誘導される一酸化窒素 (NO) の産生を抑えて大腸菌の宿主免疫機構回避に寄与することを報告した (5)。しかしながら NO が SubAB に及ぼす影響は不明であり、SubAB が NO 産生を抑えることの影響について全容解明には至っていない。そこで SubAB が毒素としての細胞致死作用のみならず、エフェクター様の因子として宿主防御機構を破綻させ、EHEC の病原性を亢進するのではないかと考えている。こうした観点から、本研究では SubAB に及ぼす NO の影響についても解析を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、SubAB の新規毒性発現機構とその制御法の解明を目指して、宿主レドックス調節分子の同定、そのレドックス調節分子を標的とした阻害剤の探索、培養細胞を用いた阻害メカニズム解析を行うことを目的とし、当該感染症の新しい診断・治療法構築へ向けた基盤研究を推進した。本研究提案は SubAB だけでなく他の細菌毒素にも幅広く応用できる阻害剤の開発を目指しており、感染症治療の大きな進展に繋がることが期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 阻害剤の探索と標的タンパク質の同定: 培養細胞において、SubAB 処理による細胞内レドックス状態の変動を調べた。ヒト上皮細胞株 HeLa 細胞に SubAB を 6 時間処理し、チオール基に対するアルキル化試薬 (HPE-IAM) を含むメタノールを用いて抽出を行い、グルタチオン量を質量分析法にて解析した。SubAB が BiP を切断するまでの毒性発現過程 (細胞内輸送・ER への局在・BiP との相互作用など) に焦点を当て、どのような宿主レドックス調節分子が SubAB の毒性発現に関わるかを解析した。レドックス調節分子に対して阻害効果を示す薬剤を探索するため、研究室所有の候補試薬と細胞を用いた阻害剤スクリーニングを行った。各種阻害剤で前処理した HeLa 細胞に SubAB を処理し 30 分、1 時間後に細胞を可溶化し、ウェスタンブロッティング (WB) にて SubAB の BiP 切断を評価した。ここで得られた結果を踏まえ、標的タンパク質が推定されたものに関しては、作用の異なる複数の阻害剤を用いるなど再評価を行った。一方、レドックス分子である NO を放出する NO ドナーや過酸化水素、還元剤 DTT を前処理した HeLa 細胞に SubAB を処理し、BiP 切断を評価した。

#### (2) 培養細胞を用いた標的タンパク質阻害メカニズムの解析

上記(1)で阻害剤の標的タンパク質が予想されるものについてさらに詳細な解析を行った。候補タンパク質に対する siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞に SubAB を処理し、BiP の切断や MTT アッセイによる細胞生存解析による評価を行った。さらに SubAB の毒性発現に関わる宿主因子として同定したタンパク質 (ヒト GSTP1) については CRISPR/Cas9 システム

による遺伝子ノックアウト (KO) 細胞を作製し、SubAB の BiP の切断を評価した。KO 細胞に GSTP1 の発現プラスミドをトランスフェクションし野生型およびシステイン変異体タンパク質を発現させた (addback した) 細胞についても同様に評価した。蛍光標識した SubAB を HeLa 細胞に処理し、蛍光顕微鏡で観察することで ER への局在を調べ、探索した阻害剤による SubAB 阻害機構を解析した。

### (3) NO による SubAB 阻害機構の解析

候補タンパク質 GSTP1 については、発現プラスミドを構築し、His-tag 融合組換えタンパク質として大腸菌内で発現させた。またシステインをセリンに 1 アミノ酸変異させた GSTP1 について同様に大腸菌にて発現させた。これらの組換え GSTP1 は大腸菌を可溶化し Ni-NTA カラムを用いて精製標品を得た。各種精製 GSTP1 の酵素活性は、グルタチオンと親電子物質 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) を基質としたグルタチオン抱合体 (アダクト) の生成速度を吸光度変化にて評価した。

## 4. 研究成果

(1) HeLa 細胞を SubAB で 6 時間処理した結果、細胞内グルタチオン量が減少した。各種阻害剤で前処理した HeLa 細胞に SubAB を処理し BiP 切断を評価した結果、グルタチオン合成酵素阻害剤 BSO、グルタチオン転移酵素 (glutathione S-transferase; GST) の阻害剤 Ezatiostat および GST の基質となる CDNB が SubAB の BiP 切断を阻害した。酸化剤として各種 NO ドナーや過酸化水素、還元剤として DTT を用いた結果、過酸化水素や DTT は阻害活性を示さなかったが、実験に用いたすべての NO ドナーが SubAB の BiP 切断を阻害した。なかでもニトロソチオール的一种である SNAP が最も阻害効果が高かった。SubAB の BiP 切断に GST が関与すること、それを NO が阻害することが示唆された。

(2) ヒトの GST の主要なサブクラスのひとつである GSTP1 をノックダウンした HeLa 細胞では SubAB の BiP 切断が阻害された。一方、NO ドナーである SNAP が SubAB の BiP 切断を阻害する機序を調べるため、NO が GSTP1 を阻害するのではないかと仮説を立てた。これを検証するため GSTP1 をノックダウンした HeLa 細胞に NO ドナーである SNAP を前処理したところ、NO による SubAB の BiP 切断阻害が消失した。ヒト GSTP1 を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウト (KO) した細胞においても同様に NO の阻害効果が消失する傾向にあったため、KO 細胞に発現プラスミドをトランスフェクションすることで GSTP1 を addback し NO による GSTP1 阻害メカニズムの解析に供した。GSTP1KO 細胞に野生型 GSTP1 を発現 (addback) させると NO による SubAB の阻害が認められた。しかし、48 番目のシステインをセリンに変異した GSTP1 (C48S) を addback しても NO による BiP 切断阻害は消失したままであった。以上の結果より SubAB の BiP 切断に GSTP1 が関与すること、それを NO が阻害することが示唆された。また、GSTP1 の他の 3 つのシステイン変異体 (C15S、C102S、C170S) を addback した解析からも、NO が GSTP1 の 48 番目のシステインを主な標的にしていることが示唆された。

(3) 組換え GSTP1 酵素を NO ドナーである SNAP で 0.5 ~ 3 時間前処理し、酵素活性として CDNB とグルタチオンのアダクト形成を評価した結果、NO 前処理時間依存的に強い酵素活性の阻害が認められた。しかし変異体酵素 GSTP1 (C48S) では NO による阻害が有意に減弱した。

以上のように SubAB の毒性発現には宿主レドックス調節分子が関与しており治療標的になることが期待された。またこれらレドックスタンパク質に対する阻害剤やレドックス分子 NO が SubAB を阻害すること、またそれらを阻害剤として活用できる可能性が示唆された。しかしながら本研究においては詳細な阻害メカニズムについて全容解明には至らなかった。宿主レドックスタンパク質群が複雑に関与して SubAB の ER への移行や BiP との会合を調節している可能性があるが、特に今回同定した GSTP1 が直接 SubAB を調節するのか、他のタンパク質を介して間接的に調節するのか不明な点が多く残されており、今後さらに詳細な解析を行いたい。

### < 引用文献 >

- Paton, A. W. et al., (2004) J Exp Med., 200(1) :35-46
- Paton, A. W. et al., (2006) Nature, 443(7111) : 548-52
- Furukawa, T. et al., (2011) Microb Pathog., 50(3-4):159-67
- Tsutsuki, H. et al., (2020) BBRC, 525(4):1068-73
- Tsutsuki, H. et al., (2012) Infect Immun., 80(11):3939-51

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsutsuki Hiroyasu, Zhang Tianli, Yahiro Kinnoyuki, Ono Katsuhiko, Fujiwara Yukio, Iyoda Sunao, Wei Fan-Yan, Monde Kazuaki, Seto Kazuko, Ohnishi Makoto, Oshiumi Hiroyuki, Akaike Takaaki, Sawa Tomohiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic Escherichia coli impairs the inflammasome and exacerbates enteropathogenic bacterial infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104050 ~ 104050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104050	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 Zhang Tianli, Tsutsuki Hiroyasu, Li Xiaoyan, Sawa Tomohiro	4. 巻 171
2. 論文標題 New insights into the regulatory roles of glutathione in NLRP3-inflammasome-mediated immune and inflammatory responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 367 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab158	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 Tsutsuki Hiroyasu, Ogura Kohei, Moss Joel, Yahiro Kinnoyuki	4. 巻 64
2. 論文標題 Host response to the subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement negative Shiga toxin-producing Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 657 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12841	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 該当する

1. 著者名 Zhang Tianli, Tsutsuki Hiroyasu, Islam Waliul, Ono Katsuhiko, Takeda Kohsuke, Akaike Takaaki, Sawa Tomohiro	4. 巻 41
2. 論文標題 ATP exposure stimulates glutathione efflux as a necessary switch for NLRP3 inflammasome activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 101930 ~ 101930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2021.101930	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 Harada Ayaka, Tsutsuki Hiroyasu, Zhang Tianli, Yahiro Kinnosuke, Sawa Tomohiro, Niidome Takuro	4. 巻 12
2. 論文標題 Controlled Delivery of an Anti-Inflammatory Toxin to Macrophages by Mutagenesis and Nanoparticle Modification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 2161 ~ 2161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano12132161	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 Tsutsuki Hiroyasu, Zhang Tianli, Yahiro Kinnosuke, Toyomoto Touya, Sawa Tomohiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Non-canonical inflammasome activation analysis in a mouse model of Citrobacter rodentium infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101741 ~ 101741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101741	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、小野 勝彦、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素Subtilase cytotoxinに対する活性窒素種の阻害作用
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会 第21回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 活性窒素種による腸管出血性大腸菌毒素subtilase cytotoxin阻害機構の解析
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津々木博康、張田力、八尋錦之助、小野勝彦、赤池孝章、澤智裕
2. 発表標題 志賀毒素産生性大腸菌毒素Subtilase cytotoxinに対する活性窒素種の作用機序の解明
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素Subtilase cytotoxinの毒性発現に対する活性窒素種の阻害機構
3. 学会等名 第21回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津々木 博康、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 宿主防御機構に及ぼす志賀毒素産生性大腸菌毒素subtilase cytotoxinの影響
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、小野 勝彦、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素Subtilase cytotoxinの細胞毒性に関わるレドックス調節機構の解析
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 第20回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津々木 博康
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素SubABによる宿主自然免疫抑制機構
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素Subtilase cytotoxinの毒性に及ぼす活性窒素種の影響
3. 学会等名 第20回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、小野 勝彦、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 一酸化窒素による腸管出血性大腸菌毒素Subtilase cytotoxinの阻害機構の解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素SubABの毒性発現に関わるレドックス調節機構
3. 学会等名 第75回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素SubABの毒性に関わる宿主レドックス調節機構
3. 学会等名 第33回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 志賀毒素産生性大腸菌毒素SubABの毒性発現に関わるレドックス調節機構
3. 学会等名 第68回トキシシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyasu Tsutsuki, Tianli Zhang, Kinnosuke Yahiro, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa
2. 発表標題 Host redox regulatory mechanisms involved in the pathogenicity of enterohemorrhagic Escherichia coli toxin SubAB
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素SubABの毒性発現に関する宿主レドックス調節の解析
3. 学会等名 第22回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroyasu Tsutsuki, Tianli Zhang, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa
2. 発表標題 Inhibitory mechanisms of enterohemorrhagic Escherichia coli toxin SubAB by nitric oxide
3. 学会等名 Nitric Oxide Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 志賀毒素産生性大腸菌毒素SubABの毒性に関わる宿主レドックス調節機構の解明
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 津々木 博康、張 田力、八尋 錦之助、赤池 孝章、澤 智裕
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌毒素SubABの病原性発現機構に関わるレドックスバイオロジ
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 札幌 (招待講演)
4. 発表年 2023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
---------	---------