

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390127

研究課題名（和文） 腸管出血性大腸菌が産生する SubAB トキシンの細胞障害機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* produced Subtilase cytotoxin-induced cell damage mechanism.

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

**研究成果の概要（和文）：**腸管出血性大腸菌(EHEC)が産生する新たな毒素 Subtilase cytotoxin (SubAB)は Stx の作用機構とは大きく異なり、小胞体中に存在するシャペロン 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。我々は本研究期間において以下のことを明らかにした。1) SubAB 処理により一過性のタンパク質合成阻害、細胞周期の停止を誘導すること。2) SubAB は BiP 切断後、PERK を介したシグナルが、Bcl-2 ファミリーの Bax と Bak の構造変化を誘導し、ミトコンドリアの膜上で Bax/Bak の会合体を形成し、このポアを使って、チトクローム c を放出させた。この放出されたチトクローム c が下流の caspase を活性化しアポトーシスによる細胞死を引き起こすこと。3) SubAB の宿主受容体として integrin を含む 4 つの膜蛋白質が毒素との結合に関与していること。4) SubAB のマウスへの腹腔内投与により、劇的な血小板減少、IL-6 の増加、腎臓におけるメサンギウムの増加、更に、上部消化管からの出血を伴う炎症性致死に至ること。これらの成果は EHEC 感染症における SubAB の役割を理解する上で非常に重要な知見であり、予防・治療等に新たな道を拓く事にもつながるものと確信している

**研究成果の概要（英文）：**Subtilase cytotoxin (SubAB) is an AB<sub>5</sub> cytotoxin produced by some strains of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. The A subunit is a subtilase-like serine protease and cleaves an endoplasmic reticulum (ER) chaperone, BiP, leading to ER stress, which induces transient inhibition of protein synthesis and cell cycle arrest at G<sub>1</sub> phase, and PERK-mediated Bax/Bak conformational change, cytochrome c release from mitochondria, followed by caspase-dependent apoptosis in mammalian cells. In addition, we showed in mice that SubAB induced small bowel hemorrhage and a coagulopathy characterized by thrombocytopenia, prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：毒素、ER ストレス、アポトーシス、受容体

## 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たが、その詳細な細胞障害機構、受容体などは不明であった。また、SubAB が個体レベルでの同様な病態発現に關与しているかも明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

SubAB による ER ストレスがどのような作用機序で細胞障害を引き起こすのか明らかにするとともに、SubAB による個体レベルでの病態を病理的、生化学的に解析を行うことを目的とした。

## 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) ミトコンドリアから放出されたチトクローム c の検出

HeLa 細胞を SubAB (0.2 mg/ml) で一定時間処理した後、細胞を回収し、50 µg/ml digitonin と protease inhibitor を含んだホモジェネートバッファーで細胞を処理した。遠心後、上清 (サイトソル画分) を回収し、Western blotting によりチトクローム c を検出した。

### 4) 免疫沈降法

#### 3-1. 構造変化した Bax/Bak の免疫沈降

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。

#### 3-2. SubAB 結合膜蛋白質の免疫沈降

HeLa 細胞の表面蛋白質をビオチン標識した後、1% TritonX-100 を含む可溶性溶液で可溶性化後、遠心し、上清を回収した。1 mg の SubAB あるいは熱失活させた SubAB を上清と混ぜた後、抗 SubAB 抗体、Protein G agarose を加え、免疫沈降し、Avidin-HRP による Western blotting により検出した。

### 5) 蛋白質合成阻害活性

24 穴プレートに Vero 細胞 ( $2 \times 10^5$ ) を撒き一夜培養する。培地を除去し、 $[^{14}\text{C}]$ leucine を含んだ新しい培地に交換し、毒素を添加して 37 度 2 時間培養した。TCA を加えて蛋白質合成を停止し、細胞を洗浄後、0.5M KOH を加え 37 度 10 分保温し細胞を破壊し、lysate 中の  $[^{14}\text{C}]$ leucine 量を定量した。

### 6) 細胞周期解析

SubAB で処理した細胞を propidium iodide で染色して FACSscan で解析した。細胞周期に影響する cyclin D1, cdk, cdk inhibitor 等は、細胞に毒素を処理した後に細胞を溶解し、SDS-PAGE を用いて蛋白質を分離し、Western blotting を行い、それぞれの特異抗体を用いて検出した。

### 7) DNA 合成への影響

SubAB 処理した細胞への BrdU の取り込みで調べた。

### 8) マウスにおける病態発現解析

メスの Balb/c マウス (4-5 週齢) に SubAB あるいは、毒素活性中心である His89 と、Ser272 を Ala に置換した変異体 SubAB (S272A/H89A) を腹腔内へ注射した後、経時的に血液の採取を行い生化学的解析を行った。また、開腹後、各臓器の病理検査を行った。

## 4. 研究成果

4-1. 細胞周期を調べたところ、SubAB 処理後 20 時間以上で、明らかに G0/G1 の細胞の増加と、S 期の細胞の減少が認められた。また、DNA 合成を調べたところ、SubAB 処理時間と共に DNA 合成の減少が認められた。SubAB 処理細胞では、G1 から S 期への移行に關与している cyclinD1 の顕著な減少が認められた。Cyclin D1 に対し、リン酸化された cyclinD1 の増加が認められた。SubAB による cyclin D1 の減少は、プロテアソーム阻害剤によって抑

制された (Fig. 1)。

SubAB は Vero 細胞の増殖を G1 期で止めることが分かった。これは G1 から S 期への移行に必要な cyclin D1 が、リン酸化されてプロテアソームで分解されることに依存していると考えられた。

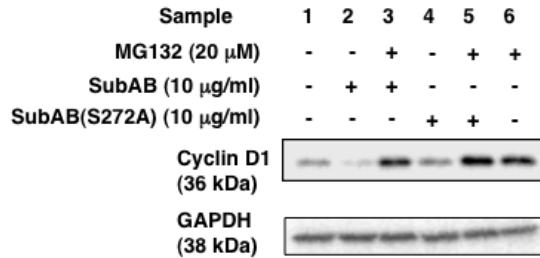


Fig. 1.

4-2. 細胞致死に直接関与する SubAB の受容体を同定するために、ビオチン標識した HeLa 細胞可溶化溶液を用いて、SubAB による免疫沈降を行った結果、p250、p175、p135 のバンドを検出した。これら膜蛋白質は MAA、DSA レクチンと反応することから、レクチンアガロースにより精製し、濃縮後、SDS-PAGE、CBB 染色を行った。目的のサイズのバンドを LC-MS/MS により解析した結果、p250 は NG2、p175 は L1CAM、 $\alpha$ 2 integrin、p135 は  $\beta$ 1 integrin、Met であった (Fig.2)。

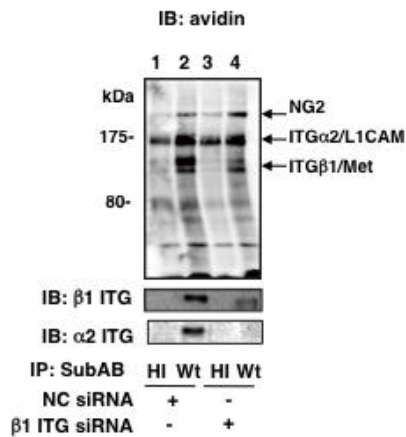


Fig.2.

糖切断酵素を用いた実験から、SubAB とこれら膜蛋白質との結合には末端糖鎖シアル酸が必須であった。

次に、どの膜蛋白質が SubAB の致死活性に直接関与しているか調べるため、それぞれの膜蛋白質の siRNA を遺伝子導入し、発現抑制後、SubAB 処理した。その結果、 $\beta$ 1

integrin の発現抑制により、最も顕著な細胞致死抑制、Bax/Bak の構造変化阻害活性、チトクローム *c* の放出抑制、カスパーゼの活性化抑制が認められた。NG2、L1CAM の発現抑制においても、わずかに細胞致死活性を抑制していた。興味深いことに、BiP の切断は阻害されていなかった。以上の結果から、腸管出血性大腸菌より分泌された SubAB は、HeLa 細胞表層の NG2、L1CAM、Met、 $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin に結合する。これらの受容体のうち、 $\beta$ 1 integrin が細胞致死に直接関与する受容体であることが判った。

4-3. SubAB 処理により、細胞への [ $^{14}$ C]leucine の取り込みは減少したが、活性部位変異体 SubAB では認められなかった。この蛋白合成阻害は時間とともに回復する一過性のものであることが判った (Fig. 3)。更に、BiP が切断されたことに依る ER stress が、蛋白合成阻害の引き金になっているかを知るために、PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン酸化を調べた。SubAB で処理により PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン酸化が生じた。つまり、SubAB この eIF2 $\alpha$  のリン酸化に起因したタンパク合成阻害であると推察された。

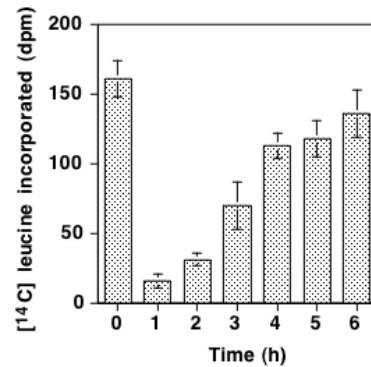


Fig. 3

4-4. SubAB は 48 時間から 72 時間でマウスに致死を誘導した。開腹所見から、上部消化管内における激しい出血、更に、脾臓の萎縮、肝臓の色素変化も認められた (Fig. 4)。変異体毒素ではこれらの変化は認められなかった。病理解析から上部消化管における出血を伴う、炎症が認められた。腎臓では、メサンギウム細胞の増加が顕著であった。生化学的解析から SubAB 投与後 6 時間には、劇的な血小板の減少が引き起こされ、血液凝固能の

減少が認められた。SubAB に依るマウスにおける致死活性は、上部消化管からの出血に依るものであると推察された。

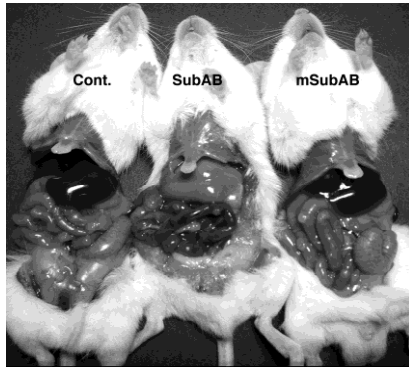


Fig. 4

4-5. SubAB の細胞死に直接関与する ER ストレスセンサー蛋白質を siRNA による発現抑制により評価した。結果、PERK の抑制により SubAB による Bax/Bak の構造変化、チトクローム *c* の放出、カスパーゼの活性化抑制が認められた。他の ER ストレスセンサー蛋白質 (Ire1 $\alpha$ , ATF6) の発現抑制では影響が無かった。つまり、PERK が SubAB による細胞死の初期シグナル伝達機構に必須なものであることが明らかとなった (Fig. 5)。又、SubAB によるチトクローム *c* のミトコンドリアからの放出、続く、カスパーゼの活性化は 26S プロテアソーム阻害剤によって阻害されたことから、SubAB のアポトーシスはユビキチン・プロテアソーム系により制御されていることが推察された。

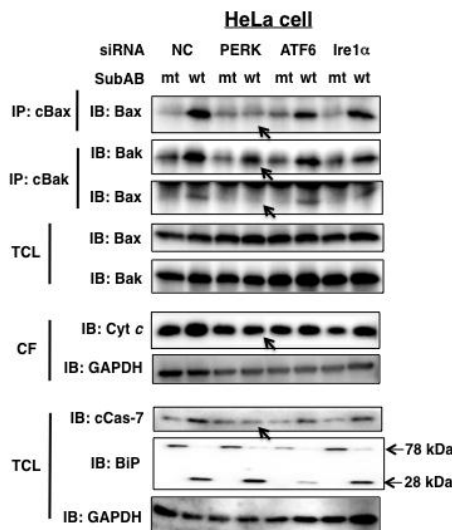


Fig. 5. TCL: total cell lysates, CF:

cytosolic fraction.

#### 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 7 件)

1. Yahiro, K., H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, J. Moss, and M. Noda. 2012. Regulation of Subtilase cytotoxin (SubAB)-induced cell death by a PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-dependent proteasome pathway in HeLa cells. *Infect Immun.* In press. 査読有
2. Ogura, K., K. Yahiro, H. Tsutsuki, S. Nagasawa, S. Yamasaki, J. Moss, and M. Noda. 2011. Characterization of cholix toxin-induced apoptosis in hela cells. *J Biol Chem* **286**:37207-37215. 査読有
3. Yahiro, K., M. Satoh, N. Morinaga, H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, F. Nomura, J. Moss, and M. Noda. 2011. Identification of Subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun* **79**:617-627. 査読有
4. Furukawa, T., K. Yahiro, A. B. Tsuji, Y. Terasaki, N. Morinaga, M. Miyazaki, Y. Fukuda, T. Saga, J. Moss, and M. Noda. 2011. Fatal hemorrhage induced by subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **50**:159-167. 査読有
5. Yahiro, K., N. Morinaga, J. Moss, and M. Noda. 2010. Subtilase cytotoxin induces apoptosis in HeLa cells by mitochondrial permeabilization via activation of Bax/Bak, independent of C/EBF-homologue protein (CHOP), Ire1 $\alpha$  or JNK signaling. *Microb Pathog* **49**:153-163. 査読有

6. Yahiro, K. 2010. Purification and characterization of bacterial cytotoxin receptors. *Nippon Saikingaku Zasshi* 65: 325-31. 査読無

7. Matsuura, G., N. Morinaga, K. Yahiro, R. Komine, J. Moss, H. Yoshida, and M. Noda. 2009. Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces apoptosis in Vero cells via mitochondrial membrane damage. *Infect Immun* 77:2919-2924.

[学会発表] (計 25 件)

1. 八尋錦之助、盛永直子、野田公俊 「プロテオーム解析による細菌毒素宿主受容体の同定と性状解析」第 6 回千葉疾患プロテオミクス研究会 2009 年 12 月 6 日 (千葉県)

2. 八尋錦之助、盛永直子、野田公俊  
「Subtilase cytotoxin induced apoptosis in HeLa cells via mitochondrial membrane damage」44<sup>th</sup> US-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting. 2009 年 10 月 12-14 日 (サンディエゴ、USA)

3. 清水健、野田公俊 「Effect of phage-inducing agent on the number of Stx2-expressed cells in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*」44<sup>th</sup> US-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting. 2009 年 10 月 12-14 日 (サンディエゴ、USA)

4. 盛永直子、八尋錦之助、野田公俊  
「Subtilase cytotoxin induces activation of Bax/Bak, leading to cytochrome c release and apoptosis」第 83 回日本細菌学会 2010 年 3 月 27 -29 日 (横浜)

5. 八尋錦之助、盛永直子、野田公俊  
「Identification of Subtilase cytotoxin receptors in HeLa cells」第 83 回日本細菌学会 2010 年 3 月 27 -29 日 (横浜)

6. 清水健、野田公俊 「Adherence of EHEC to Caco-2 cells induces the increase of Stx1 production」第 83 回日本細菌学会 2010 年 3 月 27 -29 日 (横浜)

7. 八尋錦之助、盛永直子、野田公俊  
「Identification of SubAB receptor and its signaling pathway associated with BiP cleavage leading to apoptosis.」45<sup>th</sup> US-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting. 2010 年 12 月 6-8 日 (京都)

8. 小倉康平、八尋錦之助、野田公俊 「コレラ菌由来の新規外毒素が示す標的細胞致死活性」インターラボセミナー 2010 年 12 月 11 日 (千葉)

9. 津々木博康、八尋錦之助、清水健、野田公俊 「腸管出血性大腸菌の産生する新規 SubAB トキシンによる NO 産生抑制機構の解明」インターラボセミナー 2010 年 12 月 11 日 (千葉)

10. 八尋錦之助、盛永直子、野田公俊 「腸管出血性大腸菌の産生する Subtilase cytotoxin (SubAB) の毒性発現機序の解析」第 57 回トキシンシンポジウム 2010 年 7 月 14-16 日 (滋賀)

11. 小倉康平、八尋錦之助、山崎伸二、野田公俊 「コレラ菌由来の ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有する Cholix toxin が引き起こすアポトーシスシグナル伝達機構の解析」第 58 回トキシンシンポジウム 2011 年 7 月 6 日 (東京)

12. 永澤明佳、八尋錦之助、茂谷久子、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) の細胞内侵入機序の解析」第 58 回トキシンシンポジウム 2011 年 7 月 6 日 順天堂大学 (東京)

13. 津々木博康、八尋錦之助、清水健、野田公俊 「腸管出血性大腸菌の産生する新規 SubAB トキシンによる NO 産生抑制機構の解明」第 58 回トキシンシンポジウム 2011 年 7 月 6 日 (東京)

14. 八尋錦之助、古川健、寺崎泰弘、辻厚至、盛永直子、野田公俊 「腸管出血性大腸菌の産生する SubAB のマウスにおける病態発現解析」第 58 回トキシンシンポジウム 2011 年 7 月 6 日 (東京)

15. 清水健、津々木博康、野田公俊 「腸管出血性大腸菌 NO reductase は志賀毒素 2 の産生を増加させる」第 58 回トキシンシンポ

ジウム 2011年7月6日 (東京)

16. 八尋錦之助、盛永直子、野田公俊  
「Characterization of Subtilase cytotoxin-induced apoptotic signaling pathway in HeLa cells.」International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011年9月10日 (北海道)
17. 清水健、津々木博康、野田公俊「The nitric oxide reductase of Enterohemorrhagic Escherichia coli plays an important role for the survival within macrophages」2011年9月10日 (北海道)
18. 津々木博康、八尋錦之助、清水健、野田公俊「Subtilase cytotoxin inhibits the production of nitric oxide from macrophage」2011年9月10日 (北海道)
19. 小倉康平、八尋錦之助、山崎伸二、野田公俊「Apoptotic signaling pathways in HeLa cells induced by Cholix toxin of Vibrio cholerae」International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011年9月10日 (北海道)
20. 津々木博康、八尋錦之助、清水健、野田公俊「腸管出血性大腸菌が産生するSubtilase cytotoxin はマクロファージのNO 産生を抑制する」第96回日本細菌学会関東支部総会 2011年10月6日 (東京)
21. 野田公俊「Fetal hemorrhage in mice induced by Subtilase cytotoxin of Shiga-toxigenic Escherichia coli.」第85回日本細菌学会総会 2012年3月27日 (長崎)
22. 清水健、津々木博康、野田公俊「NO biosensor plasmid for investigating NO levels within macrophages during bacterial infection」2012年3月27日 (長崎)
23. 津々木博康、八尋錦之助、清水健、野田公俊「Molecular mechanism of inhibitory effect of SubAB on nitric oxide production by macrophages」2012年3月27日 (長崎)
24. 八尋錦之助、津々木博康、小倉康平、永澤明佳、盛永直子、野田公俊「SubAB-induced

apoptosis is regulated by a PERK-dependent proteasome pathway in HeLa cells」2012年3月27日 (長崎)

25. 小倉康平、八尋錦之助、山崎伸二、野田公俊「Diversity in the mechanism of human cell death caused by ADP-ribosyltransferase Cholix toxin.」第85回日本細菌学会総会 2012年3月27日 (長崎)

[その他]  
ホームページ等

## 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 NAOKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 20092108  
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 KINNOSUKE)  
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  
研究者番号: 40586608

### (3) 連携研究者

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