

## 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 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：34310  
 研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2010 ～ 2012  
 課題番号：22790418  
 研究課題名（和文） Shiga toxin の強毒性発現に関わる部位に対する特異的プローブの開発  
 研究課題名（英文） Development peptide-based compounds which bind to the specific receptor-binding region of Shiga toxin B subunit.  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

初年度は、既知の配列ライブラリーから、Stx1 のサイト 2 に特異的に結合するプローブを同定するために、多価ペプチドをシート上に合成し、Stx1 と Stx1 のサイト 2 変異体との結合性の相違を数百種類のサンプルについて一度に評価する系を確立した。2, 3 年目は、本系を用いて、Stx1 サイト 2 特異的プローブの開発と活性評価を行った。計 361 種類の多価ペプチドをシート上に合成し、これら多価ペプチドについて、Stx1B あるいはサイト 2 変異体(G62A)との結合活性を検討し、最終的に 11 種類の候補ペプチドを同定した。11 種類のペプチドは、Stx1 のサイト 2 を特異的に認識していること、さらにベロ細胞を用いた検討から 4 種のペプチド（PQA-tet, KGA-tet, VIA-tet, YTA-tet）が Stx による毒性を低濃度で阻害することが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

To identify the peptide probes that specifically bind to one of the receptor-binding site 2 of Shiga toxin1 (Stx1), we established a novel screening system using the multivalent SPOT peptide array. We synthesized total 361 SPOT peptides on the cellulose membrane, and screened the peptides based on the binding affinities against the Stx1B subunit or Stx1 site 2 mutant (G62A). Finally, we identified 11 peptides that specifically bound to the Stx1B subunit, but not to G62A mutant. Furthermore, we found the 4 peptides among them (PQA-tet, KGA-tet, VIA-tet, YTA-tet) effectively inhibited the cytotoxicity for Stx1 in Vero cells. Thus, the multivalent SPOT peptide array technique may provide a powerful tool to identify a series of effective peptide-based Stx neutralizers which target a specific receptor binding region.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：病原性

## 1. 研究開始当初の背景

大腸菌 O157:H7 に代表される STEC による感染は、下痢や出血性大腸炎ばかりでなく時に溶血性尿毒症症候群や脳症などの生命に関わる重篤な合併症を併発する。Stx には Stx1 と Stx2 の2つのファミリーが存在し、Vero 細胞に対してはほぼ同等の毒性を示す。一方で、マウスに対する LD50 値で比較すると、Stx2 の方が Stx1 よりも 500-600 倍強毒であり、さらに臨床的にも Stx2 の方が症状の重篤化に深く関与している。しかしながら、個体レベルでの毒性発現の大きな相違に関与している分子機構については未だに明らかにされておらず、80 年代に本感染症が報告されて以来、最大の謎である。

Stx は AB5 型毒素で、B サブユニット 5 量体が標的細胞膜上の受容体である Gb3 のグロボ 3 糖部を特異的に認識し、細胞内に取り込まれる。B サブユニット 1 分子にはサイト 1-3 の 3 種類のグロボ 3 糖結合部位が存在しており、5 量体では最大 15 分子のグロボ 3 糖を結合し、結合親和性を著しく亢進させている。この現象はクラスター効果と呼ばれる。これまでに我々は、Stx1 と Stx2 とでは Gb3 に結合する際に使われている各グロボ 3 糖結合部位の重要性が異なっており、特に Stx2 のサイト 2 は機能していないのに対し、Stx1 のサイト 2 は受容体との結合に必要であること (Infect.Immun.,74, 1984-, 2006)、両者の細胞内輸送経路には相違が見られることを見いだした (未発表)。これらの知見は、サイト 2 を介する細胞内情報伝達さらにそれに続く細胞内小胞輸送機構の相違が Stx の個体レベルでの強毒性発現機構に関与していることを示唆している。この点を明らかにするためには Stx1 のサイト 2 特異的なプローブを開発すること、さらにこのプローブを用いた細胞レベル、個体レベルでの検討が必要である。すでに我々は、ペプチドライブラリー自体を多価にしてクラスター効果を発揮させた多価型ペプチドライブラリー法を開発し、Stx2 のグロボ 3 糖結合部位の一つ、サイト 3 を標的として新規ペプチド性 Stx 阻害薬 (PPP-tet) を開発することに成功した (特願 2004-295405、国際出願 PCT/JP2005/012286; 特願 2004-189801, FASEB J., 2006, Infect. Immun., 2010)。本法を用いて、Stx1 のサイト 1 あるいはサイト 2 に各々特異的に結合するプローブの開発を試みたところ、サイト 1 に結合するために必要なモチーフを同定することはできたが、サイト 2 に対する特異性を発揮するに十分なモチーフの同定には至らなかった。その理由は、サイト 2 は他のサイトに比べて構造が平坦であり、かつ静電的あるいは疎水的な相互作用を達成するに十分なアミノ酸をもたないことによる。このこと

から、サイト 2 特異的プローブを開発するためには、多価型ペプチドライブラリー法によって得られたモチーフをベースとし、さらにより厳密なサイト特性を付与しうる新たな技術開発が必須である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ランダムペプチドライブラリーによらない既知配列ライブラリーから Stx1 のサイト 2 への結合特異性を基準にスクリーニングするという戦略をとる。このために、1) クラスター効果を保持した配列既知ライブラリーを、数百種類簡便合成できる系を立ちあげる。2) 野生型 Stx1 とサイト 2 変異体との結合性の相違を数百種類のサンプルについて一度に評価できる系を立ちあげる。

1) 2) を実現するために、本研究では、Intavis AG 社のスポットペプチドシンセサイザーを用いる。本機器はセルロースシート上に一度に 384 種類のペプチドをスポット合成することが可能である。このシートを用いて野生型、ならびに変異体 Stx1B サブユニットをプロットすることにより、結合性を比較できる。ただし、本シート上にはペプチド伸張用のアミノ基が 1 価でしか発現していないので、合成できるペプチドはすべて 1 本鎖ペプチドとなり、クラスター効果は発揮できない。そこで、セルロースシート上のアミノ基に 2 価、あるいは 4 価のアミノ基を有する化合物をカップリングし、2 価あるいは 4 価のペプチドを合成することにした。これにより、1) の系を確立できる。以上の検討により、Stx1 のサイト 2 特異的プローブを開発することを目的とする。さらに得られたプローブについては、活性評価を行ない、生体での標的細胞と考えられる微小血管内皮細胞等を用い、サイト 2 を介する情報伝達さらに細胞内小胞輸送機構の相違を明らかにする。

## 3. 研究の方法

平成 22 年度

### (1) スポットペプチドシンセサイザーを用いた多価型ペプチドライブラリーのシート合成技術の開発

Intavis AG 社のスポットペプチドシンセサイザーはセルロースシート上に一度に 384 種のペプチドをスポット合成することが可能である。このとき、合成されるペプチドにクラスター効果を付与するために、シート上に 2 価あるいは 4 価のペプチドを合成する手法を確立する。まずシート上のアミノ基に、多価型ペプチド合成核構造をカップリングさせ、2 価あるいは 4 価のアミノ基を発現させる。特に 4 価の核構造は

Stx に最適化された多価型ペプチドライブラリーの核構造と同じものを使用する。さらに合成する多価型ペプチドの合成密度、基盤となるセルロースからのスペーサー長、等について最適化を行う。系の確立にあたっては、我々がこれまでに開発してきた Stx2 のサイト 3 特異的阻害薬 PPP-tet の配列 (PPPRRRR) を使用する。

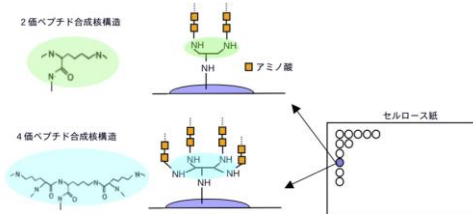


図) 配列既知多価型ペプチドシート合成技術

平成 23-24 年度

(2) Stx1 サイト 2 特異的プローブの開発

我々はこれまでに、多価型ペプチドライブラリー法を用いて Stx1 のサイト 2 を標的とした結合モチーフの同定を試みてきた。このときサブトラクションに使用したサイト 2 変異体は G62A である。この変異によって Gb3 結合能は顕減するが、この変異はわずかに -H が -CH3 に変化するにすぎない。このため最終的にサイト 2 特異性を発揮するモチーフの同定には到っていないが、Stx1 に結合するために必要なモチーフ

(X1-X2-X3-Arg-Arg-Arg) を同定することができた。さらに X1 あるいは X2 は、X3 に比べて特異性発揮に関する寄与が低いことを見いだしている。そこで、1) で確立した多価型ペプチドライブラリーのシート合成に使用する配列は、

[Ala-X2-X3-Arg-Arg-Arg] あるいは [X1-Ala-X3-Arg-Arg-Arg] とし、X のところに Cys 以外の 19 種のアミノ酸を使用すること、すなわち各々  $19 \times 19 = 361$  種類を多価型ペプチドとしてシート上にスポット合成する。これらシートを野生型ならびに変異体 Stx1B サブユニットでプロットし、結合性を比較して、最終的に Stx1 のサイト 2 特異的なモチーフを得る。得られたペプチドモチーフを多価型ペプチドライブラリーの核構造に組み込み、クラスター効果を発揮する 4 価のペプチド性プローブを開発する。

平成 24 年度

(3) (2) で同定されたプローブの活性評価

得られたプローブについて、Stx1 結合能、

結合部位特異性、Stx1 の標的細胞に対する毒性阻害活性、等の能力を評価する。結合能力測定にあたっては Biacore を用いる。同時に、ELISA 法を用いて一連の各種サイト変異体との結合活性測定を行い、サイト特異性を確認する。

(4) Stx1 のサイト 2 特異的情報伝達機構の解明

本検討では、Stx の強毒性発現に関わる分子機構を明らかにするため、Stx 感受性細胞の Vero 細胞を用い、Stx1 が細胞膜上の Gb3 に結合した際に生じる情報伝達機構を、サイト 2 特異的プローブ存在下、ならびに非存在下で比較することにより、サイト 2 特異的情報伝達機構を明らかにする。

(5) Stx1 の細胞内輸送におけるサイト 2 特異的プローブの効果

蛍光標識 Stx1 の細胞内輸送におけるサイト 2 特異的プローブの影響を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に検討する。各種オルガネラへの局在性は、オルガネラ特異的タンパク質との共局在性にて検討する。

4. 研究成果

平成 22 年度

既知の配列ライブラリーから、Stx1 のサイト 2 に特異的に結合するプローブをスクリーニングするために、Stx1 と Stx1 のサイト 2 変異体との結合性の相違を数百種類のサンプルについて一度に評価する系を確立した。具体的には、Intavis AG 社のスポットペプチドシンセサイザーを用い、専用セルロースシート上に、多価ペプチドライブラリーを合成した。系の確立にあたっては、すでに我々が開発した Stx2 のサイト 3 特異的阻害薬 PPP-tet の配列 (PPPRRRR) を使用した。シート上のペプチドを多価にするために、シート上のアミノ基に 2 価のアミノ基を有する化合物 (2 価ペプチド合成核構造) を結合させた。また、シート上のペプチドと Stx1 の結合親和性をあげるために、基盤となるセルロースシートと核構造の間のスペーサーの長さ、ペプチドの合成密度を最適化した。その結果、スペーサーの長さは炭素数 6 個 (アミノヘキサン酸 1 個分)、ペプチドの合成密度は、理論上、シート上のアミノ基すべてに 2 価ペプチド合成核構造を結合させることで、Stx1 とシート上の 2 価ペプチドが高親和性に結合することが確認された。

平成 23-24 年度

シート上のペプチドを 4 価にするために、

セルロースシート上のアミノ基に2価のアミノ基を有する化合物(2価ペプチド合成核構造)を結合させ、得られた2価アミノ基にさらに2価ペプチド合成核構造を結合させ、4価の核構造を得た。また、4価ペプチドの合成速度、基盤と成るセルロースからのスパーサーの長さについて、最適化を行った。その結果、ペプチド合成密度は、シート上のすべてのアミノ基に4価ペプチド核構造を結合させること、スパーサー長は炭素6個が最適条件であった。

次に、確立した多価型ペプチドシート合成技術を用い、Stx1のサイト2特異的結合モチーフの同定を試みた。すでに我々は、多価型ペプチドライブラリー法によりStx1への結合に必要なモチーフ(X1-X2-X3-Arg-Arg-Arg-Arg)を見いだしている。またX1, X2はX3に比べ、特異性発揮に関する寄与が低いことを見いだしていることから、(Ala-X2-X3-Arg-Arg-Arg-Arg)あるいは(X1-Ala-X3-Arg-Arg-Arg-Arg)を基本配列とし、XにはCys以外の19種類のアミノ酸を用い、各々19×19=361種類のアミノ酸配列をシート上にスポット合成した。得られたシートは、125I標識Stx1Bあるいは125I標識G62A Bサブユニット(サイト2変異体)との結合活性を検討した。その結果、125I標識Stx1Bサブユニットに特異的に結合するアミノ酸配列64種類を選定した。次に64種類のアミノ酸配列をシート上にスポット合成し、同様の検討を行い、最終的に11種類の候補ペプチドを同定した(下表)。

Tetrameric peptide
KGA-tet: (MA-KGARRRR-AU)4-3Lys
IIA-tet: (MA-IIARRRR-AU)4-3Lys
NKA-tet: (MA-NKARRRR-AU)4-3Lys
PQA-tet: (MA-PQARRRR-AU)4-3Lys
KMA-tet: (MA-KMARRRR-AU)4-3Lys
KFA-tet: (MA-KFARRRR-AU)4-3Lys
FRA-tet: (MA-FRARRRR-AU)4-3Lys
YTA-tet: (MA-YTARRRR-AU)4-3Lys
AAL-tet: (MA-AALRRRR-AU)4-3Lys
VIA-tet: (MA-VIARRRR-AU)4-3Lys
AAK-tet: (MA-AAKRRRR-AU)4-3Lys

表) 多価型ペプチドシート合成技術により同定された4価ペプチド

得られた11種候補ペプチドについて、Stx1Bサブユニットへの結合活性をELISA法により検討した。各ペプチドをプレートに固定し、

Stx1BサブユニットあるいはG62A Bサブユニットとの結合活性を調べたところ、いずれのペプチドもG62A Bサブユニットに対する結合が、野生型Stx1Bと比べて~1/3程度に低下していた。次にベロ細胞へのStx細胞障害活性に対する各ペプチドの阻害効果を検討したところ、11種のいずれのペプチドも阻害活性を示した。特に4種のペプチド(PQA-tet, KGA-tet, VIA-tet, YTA-tet)は、すでに我々が開発しているStx1のサイト1を標的としたStx阻害薬MMA-tetと同程度の濃度で、Stx細胞障害活性を阻害した。またこれら4種のペプチドについて、Stx1Bサブユニットに対する結合親和性をBiacoreを用いて検討したところ、KD値はPQA-tet: 3.3 μg/ml, KGA-tet: 1.2 μg/ml, VIA-tet: 2.5 μg/ml, YTA-tet: 2 μg/mlであった。以上のことから、本研究で確立した多価型ペプチドシート合成技術と、従来の多価型ペプチドライブラリー法の併用により、Stx1のサイト2を標的としStx細胞障害活性阻害活性を有するペプチドを同定することができた。従来法ではスクリーニングにより同定できるペプチド配列は1種類のみであったが、本技術では一度に複数種類の候補ペプチド配列を同定することが可能となった。現在、Stx1がVero細胞膜上のGb3に結合した際に生じる情報伝達機構について、現在MAPK kinase経路のp38, ERK, JNK経路に着目し解析を進めており、サイト2特異的プローブ存在下による影響を検討する予定である。また、蛍光標識Stx1の細胞内輸送におけるこれらペプチドの影響についても、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討中である。

## 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3件)

1. Watanabe-Takahashi M., Tsustuki K., Takenaka Y., Kita E., Nishikawa K., Identification of a peptide-based neutralizer that potently inhibits both Shiga toxins 1 and 2 by targeting specific receptor-binding regions., *Infection and Immunity*, 81, (2013) (掲載確定) 査読: 有
2. Watanabe-Takahashi M., Sato T., Dohi T., Noguchi N., Kano F., Murata M., Hamabata T., Natori Y., and Nishikawa K., An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin., *Infection and Immunity*, 78, pp.177-183, (2010).

査読：有

3. Kano F, Yamauchi S, Yoshida Y, Watanabe-Takahashi M, Nishikawa K, Nakamura N, Murata M., Yip1A regulates the COPI-independent retrograde transport from the Golgi complex to the ER, Journal of Cell Science, 122, pp.2218-2227, (2009).  
査読：有

[学会発表] (計 9 件)

1. 受容体結合部位を標的とした新規コレラ毒素阻害薬の開発 山本洋、西川喜代孝、高橋美帆、濱端崇 第 86 回日本細菌学会総会 2013 年 3 月
2. Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 阻害ペプチドの開発 西園貴志、西村浩輝、小林俊彦、高橋美帆、反町典子、高柳広、尾藤晴彦、西川喜代孝 第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月
3. 新規ペプチド性 Stx 阻害薬 MMA-tet と Stx との結合様式の解析 高橋美帆、津々木一恵、飯田将太、西川喜代孝 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2012 年 7 月
4. Stx 阻害薬 MMA-tet の作用メカニズムの解明 竹中康章、高橋美帆、西川喜代孝 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2012 年 7 月
5. Peptide-based STx- neutralizers for treatment of STEC infections. Watanabe-Takahashi M, Tsutsuki K., Kita E., Kiyotaka nishikawa., VTEC2012, May., The Netherland.
6. バリエント特異的 Stx 阻害ペプチドの新規スクリーニング法の確立、三井貴瑛、高橋美帆、山崎伸二、西川喜代孝、第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月
7. 受容体結合部位を標的とした新規コレラ毒素阻害薬の開発 山本洋、高橋美帆、濱端崇、西川喜代孝、第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月
8. バリエント特異的 Stx 阻害薬開発のための新規スクリーニング法の確立 三井貴瑛、章白浩、高橋美帆、山崎伸二、西川喜代孝 第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2011 年 7 月
9. 新規ペプチド性 Shiga toxin 阻害薬と Stx

との結合分子機構の解析 高橋美帆、津々木一恵、西川喜代孝、日本薬学会 第 131 年会 2011 年 3 月

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称:CT 阻害 4 価ペプチドおよびコレラ治療薬  
発明者:西川喜代孝、高橋美帆、山本洋  
権利者:学校法人同志社、(独)国立国際医療研究センター  
種類:特許  
番号:特願 2013-051032  
出願年月日:2013 年 3 月 13 日  
国内外の別:国内
2. 名称:Stx2 阻害 4 価ペプチドおよびこの Stx2 阻害 4 価ペプチドを含む治療薬  
発明者:西川喜代孝、高橋美帆、三井貴瑛  
権利者:学校法人同志社  
種類:特許  
番号:特願 2013-013746  
出願年月日:2013 年 1 月 28 日  
国内外の別:国内
3. 名称:CaMKII 阻害ペプチドおよびこれを含む CaMKII 阻害剤  
発明者:西川喜代孝、高橋美帆、西村浩輝  
権利者:学校法人同志社、国立大学法人東京医科歯科大学  
種類:特許、  
番号:特願 2011-017295  
出願年月日:2011 年 1 月 28 日  
国内外の別:国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織  
(1)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
- (2)研究分担者  
( )  
研究者番号:
- (3)連携研究者  
( )  
研究者番号: