

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390035

研究課題名(和文) Shiga toxin 2による腸管出血性大腸菌感染症重篤化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the high virulence of Stx2 in enterohemorrhagic E. coli infections.

研究代表者

西川 喜代孝 (Nishikawa, Kiyotaka)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：40218128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：志賀毒素(Stx)はO157:H7に代表される腸管出血性大腸菌が産生する主要な病原因子であり、時に致死的な合併症を引き起こす。最も頻繁に検出されるStxは、Stx1aとStx2aであるが、個体に対する毒性はStx2aのほうがはるかに強い。しかしながら、その強毒性発現の分子機構は不明であった。本研究により、Stx2aは一旦標的細胞に侵入した後、膜構造体をとって遊離すること、Stx1aではこのような現象は起こらないこと、さらにその構造体をとったStx2aが個体での強毒性を発揮する本態であることが示された。本知見により本疾患の治療にむけた新たな創薬分子の設定が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Shiga toxin (Stx) is a major virulence factor of enterohemorrhagic E. coli (EHEC), which causes bloody diarrhea, hemorrhagic colitis, and sometimes life-threatening systemic complications, such as acute encephalopathy and hemolytic-uremic syndrome. Stx can be classified into two major subgroups, Stx1a and Stx2a. Although Stx2a is highly virulent and linked with serious human disorders when compared to Stx1a, the precise molecular mechanism by which Stx2a exerts its virulence in vivo has not been elucidated at all. In this study, we found that Stx2a, but not Stx1a, released from the target cells as its active form after being processed in the cells. Interestingly, a part of this activated Stx2a constituted an exosome-like structure. This exosome-like structure was found to cause severe renal failure, such as markedly increased urine volume, suggesting a possibility of the pathological importance of this Stx2a-specific structure in the cause of systemic complications.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Shiga toxin 小胞輸送 リサイクリング 腎毒性 exosome ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

2011年5月にドイツを中心としてEU全域に発生した腸管出血性大腸菌(EHEC) O104:H4による大規模感染は、感染者数4075人、死亡者数は50人、かつ溶血性尿毒症症候群(HUS)の発症率は25%という過去に例をみない重篤化率を記録した。また、日本でも同年4月に北陸地方を中心としてEHEC O111の大規模感染が発生し、感染者数160人、死亡者数5人を数えた。これらの菌体はShiga toxin2a(Stx2a)を主要な病原因子として産生する。現在抗生物質の使用は毒素血症を引き起こす懸念から、WHOでも検討課題とされており、Stx2aの強毒性を阻害する薬剤の開発に大きな期待が持たれている。

Stxは腸管上皮細胞を障害することによって下痢や出血性大腸炎を引き起こすが、極微量でも血中に侵入してしまうと、溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症等の生命に関わる重篤な合併症を併発する。StxにはStx1ならびにStx2の2つのファミリーが存在し、またそれぞれに複数のバリエーションが存在する。Stx1ではStx1aが、Stx2ではStx2aが、各ファミリーの中で最も頻りに検出されるバリエーションである。Stx1aとStx2aはVero細胞に対してはほぼ同等の毒性を示すが、その一方でマウスに対するLD50値で比較すると、Stx2aの方がStx1aよりも500-600倍強毒であり、さらに臨床的にもStx2aの方が症状の重篤化に深く関与していることが示されている。しかしながら、その強毒性発現の分子機構については未だに明らかにされていない。従って、生体でのStx2aの強毒性発現機構を明らかにし、その過程を制御する手法を開発することは本感染症の克服にとって極めて重要である。

Stxは、細胞膜上に存在する糖脂質Gb3を受容体とし、その糖鎖部(グロボ3糖)を介して標的細胞に結合する。その後、エンドサイトーシスの過程を経て、初期エンドソーム内に取り込まれ、後期エンドソームを経由することなく、ゴルジ体(TGN,CGN)、さらに小胞体(ER)へと運ばれる。ERから毒素本体であるAサブユニットが細胞質に移行し、タンパク質合成阻害を引き起こす。この輸送経路は逆行輸送と呼ばれており、Stxの毒性発現に必須であると考えられている。最近我々は、標的細胞内でのStx2aの小胞輸送にはStx1aにはない特徴的な経路(TGNからリサイクリングエンドソームへの輸送経路)が存在していること、その結果Stx2aは活性型Stx2a(AサブユニットがプロテアーゼでプロセシングされたStx2a)となって効率よく細胞外に放出されること、さらにマウスにStx2aを静脈投与すると活性型Stx2aが血中に検出できるが、Stx2aと血漿をインキュベーションしても活性型は生じないこと、を見出した。これらの結果は、Stx2aに特徴的な細胞内小胞輸送が個体でのStx2aの強毒性発

現に密接に関与していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

Stx2aが強毒性を発現する分子機構の解明は、EHEC感染症が報告されて以来25年以上にわたって未解決の課題である。本研究では、Stx2aの細胞内輸送というユニークな視点からこの課題の解明を目指すものであり、1)先述したStx2aに特徴的な小胞輸送の分子機構を明らかにすること、2)さらにこの現象が生体内でのStx2aの強毒性発現にどのように関与しているかを解明すること、を目的とする。本研究で得られる成果は、新たな治療標的の同定、治療戦略の確立へと発展するものと期待される。

## 3. 研究の方法

(1) Stx2aに特徴的な小胞輸送の分子機構の解明は以下に示す検討によって順次推進し、その過程で得られた関連分子を新規創薬標的として確立する。

Stx1aとStx2aの細胞内輸送の相違を生むStx側の責任領域の決定。Stx1aならびにStx2aのお互いのBサブユニットを交換したハイブリッド型Stxを作製し、これら一連のStxを用いて、輸送に及ぼす影響を検討する。

Stx1aならびにStx2aのBサブユニットと受容体結合後のシグナル伝達機構の解明。本検討によりStx2aに特徴的な輸送に密接に関連しているシグナル分子を同定する。

Stxのグロボ3糖結合部位特異的阻害分子を用いてBサブユニット下流のシグナル伝達機構の解明を行なうとともに、本阻害分子を機能的に進化させることにより、輸送制御分子として発展させる。

RNA干渉法ならびにCRISPER/Cas9システムを用いた、Stx2aの細胞外へのリリースに対するRab11の関与。細胞内小胞輸送のうちリサイクリングに密接に関与しているRab11の役割を検討する。

(2) Stx2a特徴的な小胞輸送の結果細胞に遊離されるStx2a構造体の解明と、個体における強毒性発現との関連は以下の検討によって順次推進してゆく。

細胞外に放出されるStx2aの存在形態の解明ならびに性状解析。

細胞外に遊離されるStx2a構造体の活性を、細胞レベルならびにマウス個体における毒性を指標に検討する。評価にあたっては、特に臨床EHEC感染症でもっとも問題となる腎毒性に着目して行なう。

## 4. 研究成果

(1) Stx2aに特徴的な小胞輸送の分子機構の解明。

Stx1aとStx2aの細胞内輸送の相違を生

む Stx 側の責任領域の決定。我々はすでに、Stx1a と Stx2a とでは、両者の受容体認識に利用されるグロボ 3 糖結合部位が異なっていることを見出している。この相違が Stx2a に特徴的な経路に直接関与しているか否か、すなわち B-サブユニットが本経路を規定しているのか、また A-subunit の関与はあるのか、等について検討する。このため Stx1a ならびに Stx2a の A-, B-サブユニットそれぞれを入れ替えたハイブリッド Stx を作製し、それぞれの細胞内小胞輸送経路を詳細に検討する。ハイブリッド作製にあたっては、各 Stx を mg オーダーで精製したのち、ウレアによる変性、A-ならびに B-subunit を分離、お互いを入れ替えた後ウレアを除去し再会合、させることによって調製する。得られたハイブリッド型 Stx を用い、それぞれの細胞内輸送を検討した結果、A-サブユニットのタイプに関わらず、Stx2a の B-サブユニットを持っていれば活性型 Stx の細胞外への遊離が起こること、すなわち Stx2a の B-サブユニットによって本経路が規定されていることを見出した。本知見は以下に示す、B-サブユニットが受容体に結合後に発生するシグナルがその後の輸送を決定している可能性を示唆している。

Stx1a ならびに Stx2a の B-サブユニットと受容体結合後のシグナル伝達機構の解明。Stx1a ならびに Stx2a の B-サブユニットそれぞれについて、受容体に結合後その下流の各種シグナル分子の活性化を詳細に検討した。その結果、Stx1a B サブユニットについては、ERK, p38 の活性化、NF $\kappa$ B 経路の活性化を引き起こしていること、さらにこれらシグナルの下流である MIP1 $\beta$ , IL8, TNF $\alpha$  の発現誘導を起こしていることが明らかとなった。また、Stx2a B サブユニットについては、ERK, p38 の活性化を同様に引き起こしていることを明らかにした。

Stx のグロボ 3 糖結合部位特異的阻害分子を用いた B-サブユニット下流のシグナル伝達機構の解明。これまでに開発してきたペプチド性 Stx 阻害分子を用い、上記 Stx1a ならびに Stx2a によって発生するシグナルに対する効果を検討した。その結果、2 種のペプチド性 Stx 阻害分子を用いることにより、Stx1a ならびに Stx2a では毒性発現に関わるシグナルが異なっている可能性を示すことができた。特に Stx2 の毒性発現には p38 が密接に関与していることを示すことができた。この結果は、aa 特異的輸送を制御する分子を開発する上で非常に有力な標的分子が同定できたことを意味する。その一方で、この 2 種のペプチド性 Stx 阻害分子のモチーフをベースとして、Intabis AG 社の CellSpots 合成装置を用いて数百のレベルでモチーフスクリーニングを行い、p38 を制御し、さらに Stx2a の細胞外への遊離を制御する分子を

スクリーニング中である。スクリーニングにあたっては、今回新たに 4 価のペプチドを数百のレベルでシート上に合成する技術を確認し、わずか 1 アミノ酸の相違を認識するモチーフを取得する技術を確認することができた (投稿中)。

RNA 干渉法ならびに CRISPER/Cas9 システムを用いた、Stx2a の細胞外へのリリースに対する Rab11 の関与。細胞内小胞のリサイクリングに重要な役割を果たしている Rab11 に着目し、まず RNA 干渉法によって、Rab11 の 2 種のサブタイプ、Rab11a と Rab11b をそれぞれノックダウンさせる系を確立した。それぞれをノックダウンさせ Vero cell を用い、Stx1 ならびに Stx2a を取り込ませたあと、細胞内に存在している Stx (セルライゼート)、ならびに細胞外へとリリースされた Stx (TCA ppt)、リソソームで分解されて細胞外へとリリースされた Stx (TCA sup) を定量し、Stx1 と Stx2a の細胞内輸送における Rab11 の関与について検討を行った。その結果、Rab11b をノックダウンすると、Rab11a をノックダウンした場合よりも細胞外へとリリースされた Stx2a の量が有意に減少すること、すなわち St2 特異的なリサイクリング経路には Rab11b が密接に関与していることを明らかにした。すなわち、Rab11b と極めて類似した構造を有する Rab11a では関与が低いことから、本経路が厳密に制御されている可能性を示すことができたとともに、Rab11b が新たな創薬標的となり得ることが示された。

さらに、siRNA 法によるノックダウンの効率ならびに特異性を向上させるため、新たに CRISPER/Cas9 システムを導入し、安定的に各 Rab11 サブタイプをノックアウトする系の確立を試みた。その結果、siRNA 法に比し大きな改善は得られなかったものの、CRISPER/Cas9 法が有効に機能し、各サブタイプのノックアウトが可能であることが示された。これら 2 つの独立したノックダウン系を用いることにより、よりオフターゲット効果を排除した Rab11b の詳細な機能解析が可能となった。今後リサイクリング経路において重要性が示唆されている Rab7, Rab23 の関与を検討してゆく際の技術的基盤となるものと期待される。

(2) Stx2a の個体における強毒性発現と Stx2a 特徴的な小胞輸送との関連は以下の検討によって順次推進してゆく。

細胞外に放出される Stx2a の存在形態の解明ならびに性状解析。先述したように Stx2a は活性型となって細胞外に放出されるが、この遊離された Stx2a の毒性、形態に関して詳細に検討する。特に個体での Stx1a と 2a の毒性の顕著な相違に、この細胞外に遊離されてくる Stx2a が関与しているのであれば、この点に関する詳細な検討は本研究の重要な部分を構成する。まず、細胞外に放出される Stx2a を含む細胞培養上清を回収し、この上清をゲル濾

過にて分画した。純品のStx2aは低分子量画分に分画されるにも関わらず、細胞培養上清に回収されるStx2aの一部は高分子量画分に分画されること、このサイズはexosomeとして知られている細胞由来の小胞画分と一致することを見出した。このことは細胞培養上清に回収されるStx2aはexosome様の膜構造体を構成している可能性があることを示している。そこで、exosomeのマーカータンパクであるAlixならびにtsg101の抗体を用いて検討したところ、これら分子が本画分に存在すること、さらにこれら分子はStx2aに対する抗体で免疫沈降させること、さらに超遠心分画法によってもこれらマーカーと同じ画分に高分子量画分中のStx2aが分画されることを見出した。これらの結果は、細胞外に放出されるStx2aの一部はexosome様の構造体(exo-Stx2a)を構成していることを明瞭に示している(図1)。

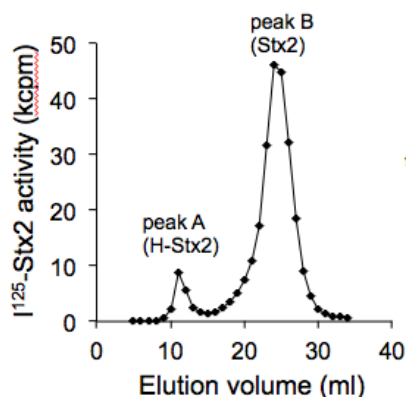


図1

細胞外に遊離されるStx2a構造体の細胞レベルならびにマウス個体における毒性。上記細胞培養上清に回収されるexo-Stx2aと純品Stx2aの細胞障害活性をVero細胞を用いて調べたところ、ほぼ同じ細胞毒性を示すことが示された。これに対し、両者を個体死を起こさない量(Stx2a量; 0.1, 0.3 ng/body)でマウスに投与したところ、0.1 ng/bodyで投与4日後、0.3 ng/bodyで6日後をピークとして、exo-Stx2aを投与した場合にのみ著しい尿量の増加が観察された(図2)。このとき腎尿細管にexo-Stx2aを投与した場合により重篤な組織障害が観察された。本結果はexo-Stx2aが形成されることが個体でのStx2aの強毒性の本体である可能性を強く示唆する初めての知見である。

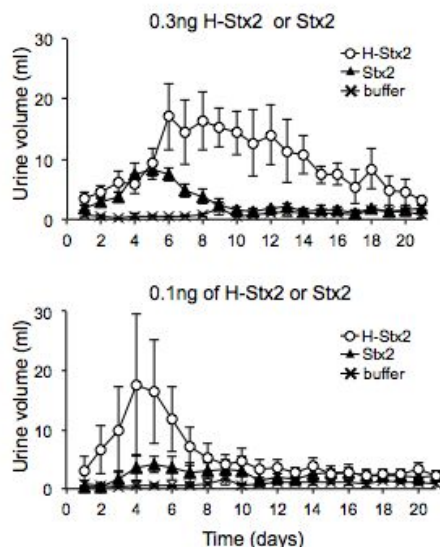


図2

## 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2件)

- 1) Watanabe-Takahashi M.#, Kato M.#, Shimizu E., and Nishikawa K.\*, Identification of a wide range of motifs inhibitory to Shiga toxin by affinity-driven screening of customized divalent peptides synthesized on a membrane, **Appl. Environ. Microbiol.**, 2015, 81, 1092-1100. doi: 10.1128/AEM.03517-14, PMID: 25452283. #Equal contribution. (査読あり)
- 2) Watanabe-Takahashi M.#, Tsutsuki K.#, Takenaka Y., Kita E. and Nishikawa K.\*, Identification of a peptide-based neutralizer that potently inhibits both Shiga toxins 1 and 2 by targeting specific receptor-binding regions, **Infect. Immun.**, 2013, 81, 2133-2138. #Equal contribution. (査読あり)

(学会発表)(計19件)

- 1) BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)(神戸ポートアイランド、2015/12/1-4)、新規小胞輸送阻害薬を用いた志賀毒素のアポトーシス死誘導活性の抑制、服部 隆行、高橋 美帆、椎名 勇、大橋 愛美、旦 慎吾、西川 喜代孝、内藤 幹彦
- 2) Affinity-driven screening of customized divalent peptides synthesized on a membrane identifies a wide range of

- inhibitory motifs against Shiga toxin, Watanabe-Takahashi M, Kato M., Shimizu E., Nishikawa K., the 9<sup>th</sup> International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections, the Westin Boston Waterfront Hotel in Boston, 13-16 Sep. 2015, in Boston, US.
- 3) Peptide-based Stx-neutralizers of treatment of STEC infections., Nishikawa, K., Seminar Series Fall 2015, Pathology and Laboratory Medicine, Boston Univ. Sch. Med., 2015.9.17, Boston, US. (招待講演)
  - 4) 第19回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (国立医薬品食品衛生研、2015/7/9-10)、新規小胞輸送阻害薬を用いた志賀毒素による細胞死の抑制、服部隆行、高橋美帆、椎名勇、大橋愛美、旦慎吾、西川喜代孝、内藤幹彦
  - 5) 第88回日本細菌学会総会 (岐阜、長良川国際会議場、2015/3/26-28) 異なった受容体結合部位を標的とする Stx 阻害薬の併用による相乗効果、高橋美帆、清水英子、加藤美帆子、西川喜代孝
  - 6) 第88回日本細菌学会総会 (岐阜、長良川国際会議場、2015/3/26-28) AB5型細菌毒素に対する多価型ペプチド性阻害薬の開発、西川喜代孝 (招待講演)
  - 7) 日本薬学会第135回年会 (神戸、2015/3/25-28) 新規小胞輸送阻害薬による志賀毒素の細胞死誘導活性の抑制、服部隆行、高橋美帆、椎名勇、大橋愛美、旦慎吾、西川喜代孝、内藤幹彦
  - 8) 第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (同志社大学・寒梅館、2014/7/15-16)、プロテアソーム阻害薬による志賀毒素誘導性細胞死の抑制、服部隆行、高橋美帆、大岡伸通、西川喜代孝、内藤幹彦
  - 9) 第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (同志社大学・寒梅館、2014/7/15-16)、受容体結合部位特異的 Stx 阻害薬の組み合わせによる阻害効果の増強、高橋美帆、清水英子、加藤美帆子、西川喜代孝
  - 10) 日本薬学会第134回年会 (熊本大学、2014/3/27-30) 志賀毒素耐性 THP-1 細胞クローンの単離と解析、服部隆行、高橋美帆、西川喜代孝、内藤幹彦
  - 11) 第36回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド、2013/12/3-6, ポスター発表)、Inhibition of Stx-induced cell death by proteasome inhibitor, Hattori, T., Takahashi, M., Ohoka, N., Nishikawa, K., Naito, M.
  - 12) 第36回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド、2013/12/3-6, ポスター発表) 志賀毒素の分子動力学シミュレーション, 尾又一実(国立国際医療研究センター)、奥村久士(分子研、総研大)、森義治(分子研)、西川喜代孝
  - 13) CBI学会2013年大会(タワーホール船堀、2013/10/28-31)、Molecular Dynamics Simulation of Shiga Toxin, Omata K., Okumura H., Mori Y., and Nishikawa K.
  - 14) 第63回日本薬学会近畿支部総会(同志社女子大学京田辺キャンパス、2013/10/12)、新規腸管出血性大腸菌感染症治療薬の開発、西川喜代孝 (招待講演)
  - 15) Peptide-based Stx-neutralizers of treatment of STEC infections., Nishikawa, K., International Symposium "New trends of anti-infection strategy" on The 86<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society For Microbiology, 2013.3.20, Chiba, Japan. (招待講演)
  - 16) バイオビジネスアワード JAPAN (大阪商工会議所・大阪医薬品協会等主催、大阪産業創造館、2013/2/15) 腸管出血性大腸菌感染症の新たな治療薬、西川喜代孝 (招待講演)
  - 17) 第16回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (秋田、パーティーギャラリーイヤタカ、2012/7/19、口頭発表) 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 (\*若手奨励賞受賞)
  - 18) 第16回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (秋田、パーティーギャラリーイヤタカ、2012/7/19、口頭発表) 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 (\*奨励賞受賞)
  - 19) Peptide-based Stx-neutralizers for treatment of STEC infections., Watanabe-Takahashi, M., Tsutsuki, K., Kita, E., Nishikawa, K. \*(presenter), the 8<sup>th</sup> International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections, 6-9 May 2012 in Amsterdam, the Netherlands., \* The prize for the Best Poster on Prevention, Control and Treatment: Animal and Human.
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)
- 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、清水英子、山崎伸二

権利者：学校法人同志社、公立大学法人大阪府立大学  
種類：特許  
番号：特願 2013-13746  
出願年月日：2013 年 1 月 28 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

1) 同志社大学と京田辺市・京田辺市教育委員会が主催する公開講座（京たなべ・同志社ヒューマンカレッジ、2015年5月23日、同志社大学京田辺校地）O157 感染症に対するお薬を創る、西川喜代孝

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西川 喜代孝 (Nishikawa Kiyotaka)  
同志社大学・生命医科学部・教授  
研究者番号：40218128

##### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：