

腸管出血性大腸菌感染症治療薬の開発

2005

渡邊 美帆

目次

論文リスト.....	1
略号リスト.....	2
第一章 緒論.....	3
第二章 直鎖ポリマーを基材とした高親和性ペロ毒素阻害剤 Gb3-polymer の開発.....	9
第三章 カルボシランデンドリマーを核構造とした Stx 中和剤の最適 構造の同定.....	21
第四章 総括.....	44
謝辞.....	46
実験の部.....	47
引用文献.....	52

論文リスト

1. Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections.

Watanabe M, Matsuoka K, Kita E, Igai K, Higashi N, Miyagawa A, Watanabe T, Yanoshita R, Samejima Y, Terunuma D, Natori Y, Nishikawa K.

J Infect Dis. 189(3):360-368 (2004)

2. Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation.

Nishikawa K, Matsuoka K, Watanabe M, Igai K, Hino K, Hatano K, Yamada A, Abe N, Terunuma D, Kuzuhara H, Natori Y.

J Infect Dis. 191(12):2097-2105 (2005)

略号リスト

ACHN	Human renal adenocarcinoma cell line (ヒト腎癌由来細胞株)
BSA	bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
Stx1BH, Stx2BH	Histidine-tagged Stx1 B-subunit, Histidine-tagged Stx2 B-subunit (ヒスチジンタグ Stx1 B-サブユニット、ヒスチジンタグ Stx2 B-サブユニット)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium (ダルベッコ変法イーグル基礎培地)
FCS	fetal calf serum (ウシ胎仔血清)
Gb3	globotriaosyl ceramide (グロボトリオシルセラミド)
HBSS	Hank's balanced salt solution (ハンクス平衡塩)
IC ₅₀	50% inhibitory concentration (50%阻害濃度)
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside (イソプロピルチオ- β -D-ガラクトシド)
¹²⁵ I-Stx1, ¹²⁵ I-Stx2	¹²⁵ I labeled Stx1, ¹²⁵ I labeled Stx2 (¹²⁵ I ラベル化 Stx1、 ¹²⁵ I ラベル化 Stx2)
K _D	dissociation constant (解離定数)
LD ₅₀	50% lethal dose (50%致死量)
NTA sensor chip	nitrotriacetic acid sensor chip (ニトリロトリ酢酸センサーチップ)
PBS	phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩液)
RU	resonance unit (レゾナンスユニット)
SAM	self-assembled monolayer (自己集合型単分子膜)
SDS	sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
STEC	Shiga toxin-producing <i>E coli</i> (ベロ毒素産生性大腸菌)
Stx	Shigatoxin (志賀毒素、ベロ毒素)
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)

第一章 緒論

O157 などの腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) の感染は、下痢や血便 (出血性大腸炎) などの消化管障害だけでなく、時に溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などの重篤な合併症を引き起こす⁽¹⁻⁴⁾。EHEC は、ベロ毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC) ともよばれるように、ベロ毒素 (Shiga toxin: Stx) が主要な病原因子である。腸管から血中に侵入した Stx による、腎や脳などの標的臓器の微小血管内皮細胞の障害が、上記のような合併症の原因であると考えられている。従って、腸管において大量に産生された Stx と強力に結合し、その血中への侵入を阻害する Stx 吸着剤や、すでに血中に侵入してしまった微量の Stx に結合し、標的細胞への侵入を阻害するような Stx 中和剤は、STEC 感染症の有効な治療薬になると考えられる。

Stx は Stx1 と Stx2 の二つのファミリーから構成される。Stx1 ファミリーには赤痢菌の産生する志賀毒素と全く同じ構造を有する Stx1 とそのバリエーション、Stx2 ファミリーには Stx1 と約 60% の相同性を有する Stx2 とそのバリエーションが各々存在する。Stx1 と Stx2 は *in vitro* では、Stx に高感受性を示すベロ細胞や一部の HeLa 細胞に対しほぼ同程度の細胞障害活性を示す。しかし、マウスにおいて LD₅₀ 値を比較したところ、Stx2 の毒性は Stx1 よりも数百倍強いことが示されている。疫学的にも Stx2 産生菌の感染と重篤な合併症の併発には強い関連性があると言われている^(5,6)。しかし、Stx2 の毒性が個体レベルで強くなる理由は現在まで明らかになっていない。

Stx は A-subunit (分子量約 33 kDa) 1 分子と B-subunit (分子量約 7.6 kDa) 5 分子が非共有結合した分子量約 70 kDa のタンパク質である。Stx A-subunit はさらに A1-subunit と A2-subunit に分けられ、A1-subunit が毒性の本体である RNA *N*-グリコシダーゼ活性を有している^(7,8)。また A1-subunit は、28S RNA の 5' 末端から 4324 番目のアデノシンの *N*-グリコシド結合を特異的に加水分解することによって、リボソーム 60S subunit を失活させる。その結果、アミノアシル tRNA の 60S subunit への結合が阻害され、タンパク合成阻害が起こり細胞が死に至る。一方、Stx B-subunit の 5 分子はドーナツ状に五量体を形成している。そのドーナツリングを A2-subunit が貫通し、A-subunit と B-subunit が結合している⁽⁹⁾。また Stx B-subunit の 5 分子は、標的細胞膜上に存在する中性糖脂質 Gb3 (globotriaosyl ceramide; Gal α 1-4 Gal β 1-4 Glc β 1-Cer) に結合する⁽⁴⁾。Gb3 は、脂

質部分のセラミドに Gal α 1-4 Gal β 1-4 Glc のグロボ 3 糖が結合した構造をしている。Stx の毒性発現には、このグロボ 3 糖と Stx の結合は必須であり、Stx B-subunit とグロボ 3 糖が複合的に相互作用することで Stx と Gb3 との結合親和性を著しく亢進させている (Fig. 1)⁽¹⁰⁾。従って、グロボ 3 糖を高度に集積させた化合物は Stx と強固に結合し、その毒性をブロックする Stx 阻害剤となりうると考えられる。

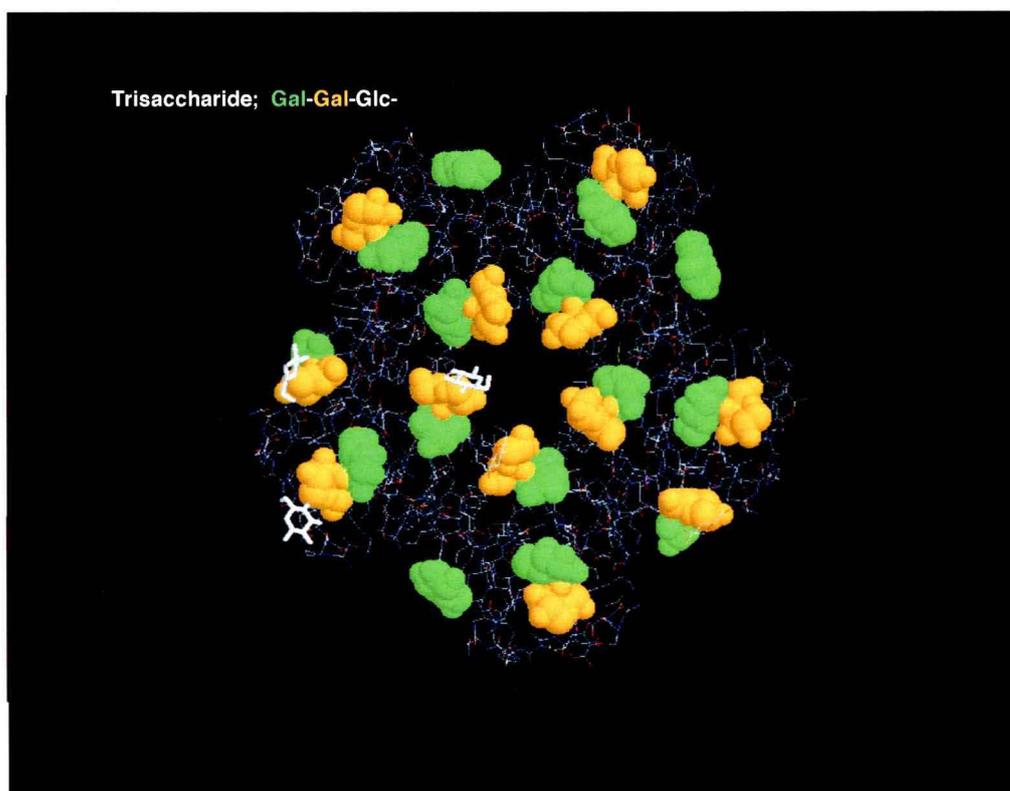


Fig. 1 Stx1 B-subunit と Gb3 のグロボ 3 糖の結合

H. Ling et al., *Biochemistry*, (1998):37:1777-1788

このような考えをもとに、これまで、以下に示すような腸管または血中で Stx を阻害する 2 つのタイプの Stx 阻害剤の開発が行われている。

1, 腸管における Stx 阻害作用を示す Stx 吸着剤

1-1. Armstrong らは、シリカ樹脂を用い、Stx に特異的な吸着剤 Synsorb Pk (Pk, P 式血液型としての Gb3 糖鎖の名称) を開発した⁽¹¹⁾。Synsorb Pk は、Gb3 糖鎖がシリカ樹脂表面にランダムに多数結合しているものである。*in vitro* において Synsorb Pk は Stx の細胞障害活性に対して阻害効果を示し、また臨床第 I 相試験で毒性を示さないことが確認された⁽¹²⁾。しかし、その後、臨床第 II 相、第 III 相試験が行われたが、STEC 感染後の HUS の発症に対する有効性は証明されなかった⁽¹³⁾。

1-2. Paton らは、大腸菌の菌体表面を覆っているリポ多糖の糖鎖末端にグロボ 3 糖を高発現させた遺伝子組み換え大腸菌を開発した⁽¹⁴⁾。先ず、リポ多糖の糖鎖末端に Glc を有する大腸菌を作製し、次にこの Glc の先に Gal α 1-4 Gal の糖鎖を付加するために、 α 、 β の 2 種類の Gal 転移酵素を遺伝子導入した。得られた菌体を、マウスの STEC 感染モデルに STEC 接種直後から連日経口投与したところ、マウスに対する STEC 感染の致死性を完全に抑制することが示された。しかし、投与するものは大腸菌そのものであり、人への適用は困難と考えられている。

2, 血中で Stx の毒性を抑制する Stx 中和剤

2-1. Kitov らは、グルコースを基本骨格とし、水酸基 5 個それぞれにスパーサーを介してグロボ 3 糖を結合させた化合物、STARFISH を開発した⁽¹⁰⁾。STARFISH は、分子全体で計 10 個の Gb3 糖鎖をもっている。*in vitro* において、STARFISH は Stx1 および Stx2 の細胞毒性を阻害することが示された。しかし、マウス感染実験において、Stx1 と STARFISH をマウス皮下に同時投与した場合、Stx1 の致死性は阻害されたが、Stx2 に対しては全く効果が見られなかった⁽¹⁵⁾。

2-2. 松岡らは、ケイ素原子を分岐核とし、カルボシラン dendrimer (樹枝状化合物) を骨格に持ち、末端にグロボ 3 糖を 3, 6, 12 個集積させた化合物 SUPER TWIG (0)3, (1)6, (1)12 (括弧内の数字 (0), (1), 核構造の Si の世代数; 括弧外の数字, グロボ 3 糖の数) を合成した (Fig. 2)⁽¹⁶⁾。我々の

グループは SUPER TWIG (0)3, (1)6, (1)12 を用いてそれぞれの Stx1 及び Stx2 に対する阻害効果を検討した。その結果、*in vitro* において SUPER TWIG (1)6, (1)12 が Stx1, Stx2 に対し高親和性に結合し、Stx1, Stx2 の標的細胞への結合と細胞毒性を低濃度で阻害することを明らかにした⁽¹⁷⁾。一方、SUPER TWIG (0)3 の Stx 結合阻害活性は低く、また Stx 細胞毒性阻害効果も低下していた。さらに、マウスを用いた O157 感染実験において、SUPER TWIG (1)6 を静脈投与した場合、Stx の致死性が顕著に抑制された。従って、SUPER TWIG (1)6 が静脈投与型の STEC 感染治療薬となりうることを示した。

- 2-3. STARFISH を開発したグループは、SUPER TWIG を報告してから約 1 年後に STARFISH の改良型 Daisy を開発した⁽¹⁵⁾。Daisy は、STARFISH の核となるグルコースとグロボ 3 糖のあいだのスペーサーの長さを炭素 5 個分延長した化合物である。Daisy と Stx2 をマウス皮下に同時投与したところ、Stx2 の致死性は効率よく抑制され、またマウスの感染実験においても、Daisy を投与したマウスに延命効果が認められた。

以上の Stx 阻害剤のなかで注目すべき点は、経口で投与可能な合成化合物が存在していないことである。腸管において、Stx を効果的に吸着する経口投与型の Stx 阻害剤は、感染症予防や治療としても実用的であると考えられる。そこで、本研究において先ず、腸管で作用する経口投与型の Stx 吸着剤を開発することとした。

また、我々のグループが開発した SUPER TWIG (1)6 が、マウス感染実験で効果を示したことを 2-2) で述べたが、このとき興味深い結果が得られた⁽¹⁷⁾。即ち、SUPER TWIG (0)3, (1)6, (1)12 を、致死量の Stx2 とともにマウスに静脈投与したところ、SUPER TWIG (1)6 のみが体重 1 g あたり 5 μ g という低用量で Stx2 の致死性を阻害した。これに対し SUPER TWIG (0)3 では、全く延命効果が認められなかった。また、SUPER TWIG (1)12 は *in vitro* において、SUPER TWIG (1)6 とほぼ同程度の Stx 阻害活性を有したが、マウスへの投与実験においては、50 μ g を投与しても若干の延命効果を示すにとどまった。さらに、生体内における SUPER TWIG (1)6 の作用機構について検討を行ったところ、二つの機構を介して作用していることが明らかとなった。一つ目は、SUPER TWIG (1)6 が血中で Stx と強固に結合し、その標的細胞内への侵入を阻害する機構、二つ目は、

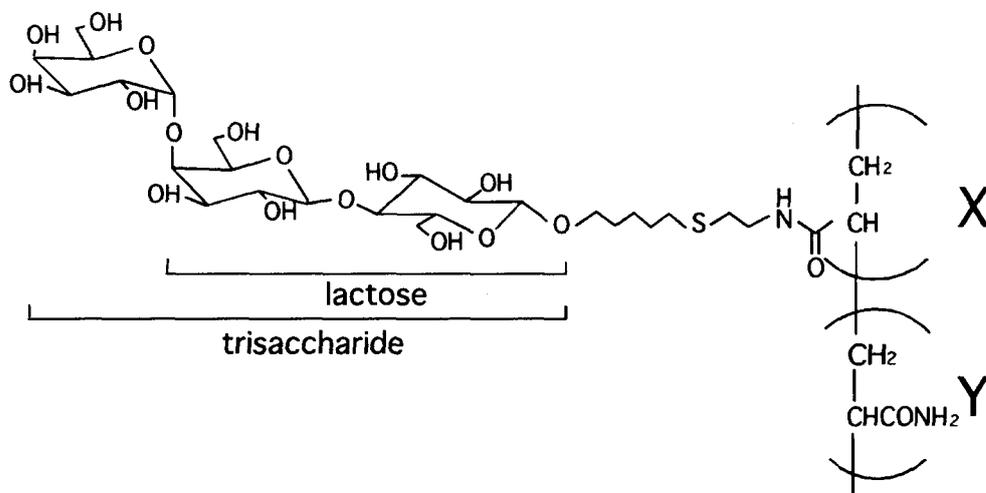
脾臓、肝臓といった網内系組織に存在するマクロファージが関与する機構である。マクロファージは普段は Stx とほとんど結合しないが、Stx が SUPER TWIG (1)6 と結合し複合体を形成すると、効率よくこの複合体を取り込むようになり、その後すみやかに Stx を分解することが明らかとなった。しかし、SUPER TWIG (1)12 は、Stx と複合体を形成するが、マクロファージによる取り込み、分解は顕著に低下していた。おそらく、SUPER TWIG (1)12 の場合、この2つ目の機構が働いていないため、*in vitro* では Stx2 阻害活性を有するにもかかわらず、マウスの Stx2 投与実験では効果が減弱していたものと考えられた。

これらのことから、血中で SUPER TWIGs が Stx 阻害活性を示すためには、SUPER TWIGs に糖鎖を多くつけるだけでは効果は期待できず、SUPER TWIG (1)6 に見られるような最適な構造が要求されることが考えられた。そこで、次に本研究で血中において SUPER TWIGs が Stx2 と結合し、その毒性をブロックすることを指標にして、最小最適な SUPER TWIG の構造を同定することとした。

第二章 直鎖ポリマーを基材とした高親和性ベロ毒素阻害剤 Gb3-polymer の開発

第一節 はじめに

本章では、ポリアクリルアミドポリマーを用い、Stx 吸着剤としての効果を検討した。前章で述べたように、Stx とグロボ 3 糖との複合的な相互作用が、Stx と Gb3 との高親和性結合を亢進させることが知られている。そこで、ポリアクリルアミドにグロボ 3 糖を種々の密度に集積させた化合物 Gb3-polymer を合成した⁽¹⁸⁾。Fig. 3 に Gb3-polymer の構造を示す。Gb3-polymer はポリアクリルアミドを主鎖として、スペーサーを介して種々の密度のグロボ 3 糖を集積させている。グロボ 3 糖の結合しているユニット X と、結合していないユニット Y の比率を変えることによってポリマー上の糖集積度を変化させることができる。本研究では、Fig. 3 に示すような 5 種類の Gb3-polymer を用いた。種々の密度でグロボ 3 糖が結合した 4 種の化合物と、ラクトースが結合した化合物である。また、以後の実験で互いに直接比較できるように、各ポリマーはグロボ 3 糖のモル濃度に換算した。



polymers X : Y	mol of trisaccharide or lactose/g
Gb3-polymer 1:0	1.4 × 10 ⁻³
2:17	0.75 × 10 ⁻³
1:11	0.66 × 10 ⁻³
1:12	0.63 × 10 ⁻³
Lac-polymer 1:0	1.7 × 10 ⁻³

Fig. 3 Gb3-polymer の構造

第二節 Gb3-polymer の Stx B-subunit に対する解離定数 K_D の測定

Gb3-polymer と Stx B-subunit の親和性を検討するため、BIAcore system を用いて解析を行った。BIAcore の Nitrilotriacetic acid (NTA) センサーチップ上にリコンビナント Histagged Stx 1B-subunit (Stx1BH) 及び Stx 2B-subunit (Stx2BH) を固定し、種々の濃度のポリマー (アナライト) を流して、結合量を測定した (Fig. 4)。得られたセンサーグラム (Fig. 5) から Gb3-polymer の Stx B-subunit に対する K_D 値を、グロボ 3 糖のモル濃度に換算して Scatchard plot により算出した。グロボ 3 糖が最も高密度に集積した Gb3-polymer 1:0 は、Stx1BH、Stx 2BH 両方に対し高親和性で結合しており、 K_D 値はそれぞれ $0.34 \mu\text{M}$, $0.68 \mu\text{M}$ であった (Table 1)。Gb3-polymer 1:0 と同じ構造だが、末端のガラクトースが一つ少ない Lac polymer 1:0 は、Stx1BH, Stx2BH 両者に全く結合しなかった (Fig. 5)。以上のことから、末端のガラクトースは Stx B-subunit との高親和性結合に必須であることが示された。次に、集積密度を変化させた Gb3-polymer 2:17, 1:11, 1:12 の K_D 値を調べたところ、Stx1BH に対しては、どの Gb3-polymer もほぼ同程度の親和性を示したが、Stx2BH に対しては、糖密度に依存して K_D 値が大きくなり、Gb3-polymer 1:0 の K_D 値の約 2, 6 及び 10 倍大きくなっていった (Table 1)。従って、Stx2 B-subunit と高親和性で結合するためには Gb3-polymer はより高密度にグロボ 3 糖が集積していることが重要であることが示された。また、Stx1 と Stx2 では糖鎖認識機構が異なることが考えられた。

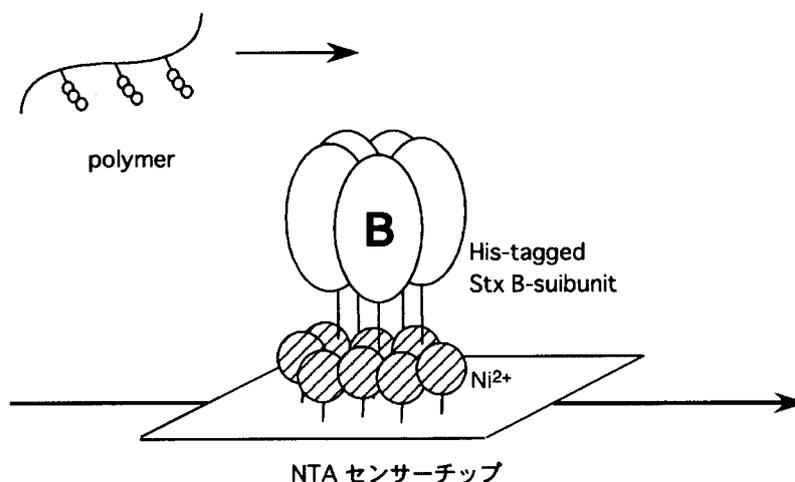


Fig. 4 BIAcore による測定

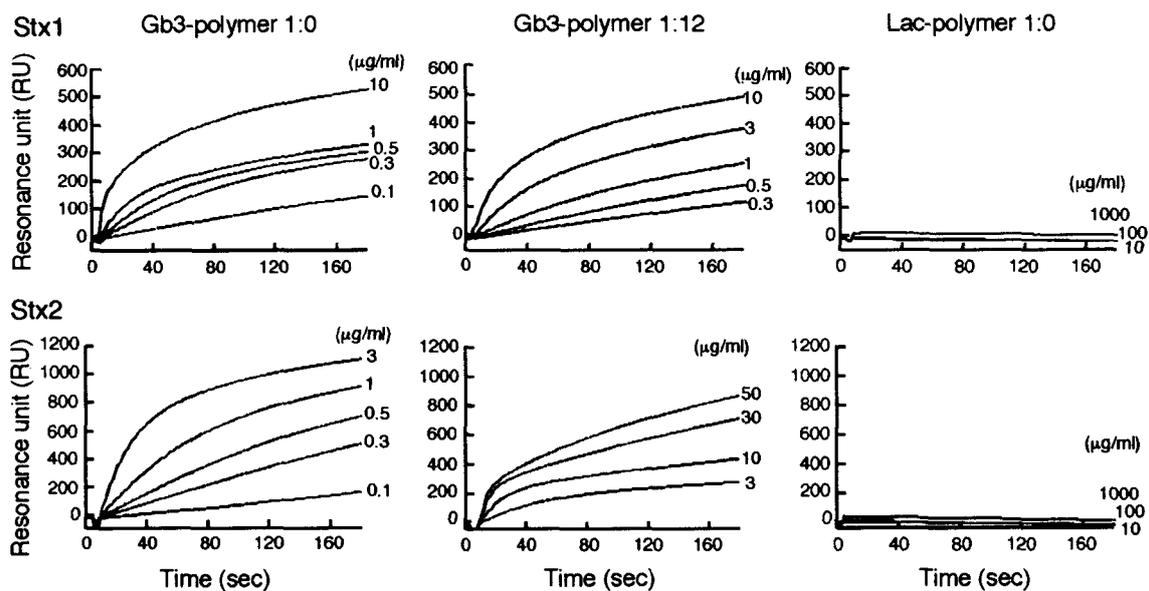


Fig. 5 NTA センサーチップ上に固定した Stx1BH または Stx2BH (リガンド) に Gb3-polymer または Lac-polymer (アナライト) を流したときのセンサーグラム

Gb3-polymer	Stx1 B-subunit		Stx2 B-subunit	
	K_D ($\mu\text{M} \pm \text{SE}$)	RU_{max} ($\text{mean} \pm \text{SE}$)	K_D ($\mu\text{M} \pm \text{SE}$)	RU_{max} ($\text{mean} \pm \text{SE}$)
1:0	0.34 ± 0.05	468 ± 28	0.68 ± 0.05	1340 ± 67
2:17	0.44 ± 0.11	614 ± 60	1.4 ± 0.26	803 ± 50
1:11	0.43 ± 0.12	604 ± 80	4.2 ± 0.57	1380 ± 56
1:12	0.60 ± 0.06	560 ± 6	7.1 ± 0.64	961 ± 73

Table 1 Gb3-polymer の Stx1 B-subunit または Stx2 B-subunit に対する解離定数 K_D と最大結合量 (RU_{max})

第三節 Stx の生物活性に対する各 Gb3-polymer 阻害効果

Stx に高感受性を示すベロ細胞 (アフリカミドリザル腎由来細胞) を用い、以下の実験を行った。

3-1) Stx 結合阻害効果

^{125}I -Stx1, ^{125}I -Stx2 のベロ細胞への結合に対する各 Gb3-polymer の阻害活性を検討したところ、Gb3-polymer 1:0 の ^{125}I -Stx1, ^{125}I -Stx2 の結合に対する IC_{50} はそれぞれ 0.33 μM , 0.34 μM であった。その他の Gb3-polymer もほぼ同程度の IC_{50} 値を示した (Fig. 6, Table 2)。Lac-polymer 1:0 は 100 μM の濃度でも全く阻害効果は見られなかった (data not shown)。

3-2) Stx 細胞障害活性阻害効果

ベロ細胞を用いて、各 Gb3-polymer の Stx 細胞障害活性阻害効果を検討した。Gb3-polymer 1:0, 2:17 の Stx1 の細胞障害に対する IC_{50} はそれぞれ 0.05 μM , 0.16 μM で、糖密度が下がると約 3 倍高くなった (Table 2)。Stx2 に対する IC_{50} はそれぞれ 0.82 μM , 18.8 μM で、23 倍高くなった。これらの結果から、Stx1 に比べ Stx2 の方がポリマーの阻害効果が顕著であり、ポリマー上の糖密度に依存していることが考えられた。また、Stx1 の糖認識による糖集積の効果は、Stx2 の場合とは異なっていることが考えられた。一方、Lac polymer 1:0 や、遊離グロブ 3 糖は 100 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でも阻害活性は見られなかった (Fig 6)。また、ポリマーそれ自身には細胞毒性はみとめられなかった (data not shown)。以上のことから、高度に集積させた Gb3-polymer ほど Stx の細胞毒性を阻害し Stx1 だけでなく Stx2 に対しても効果を示すことが明らかとなった。

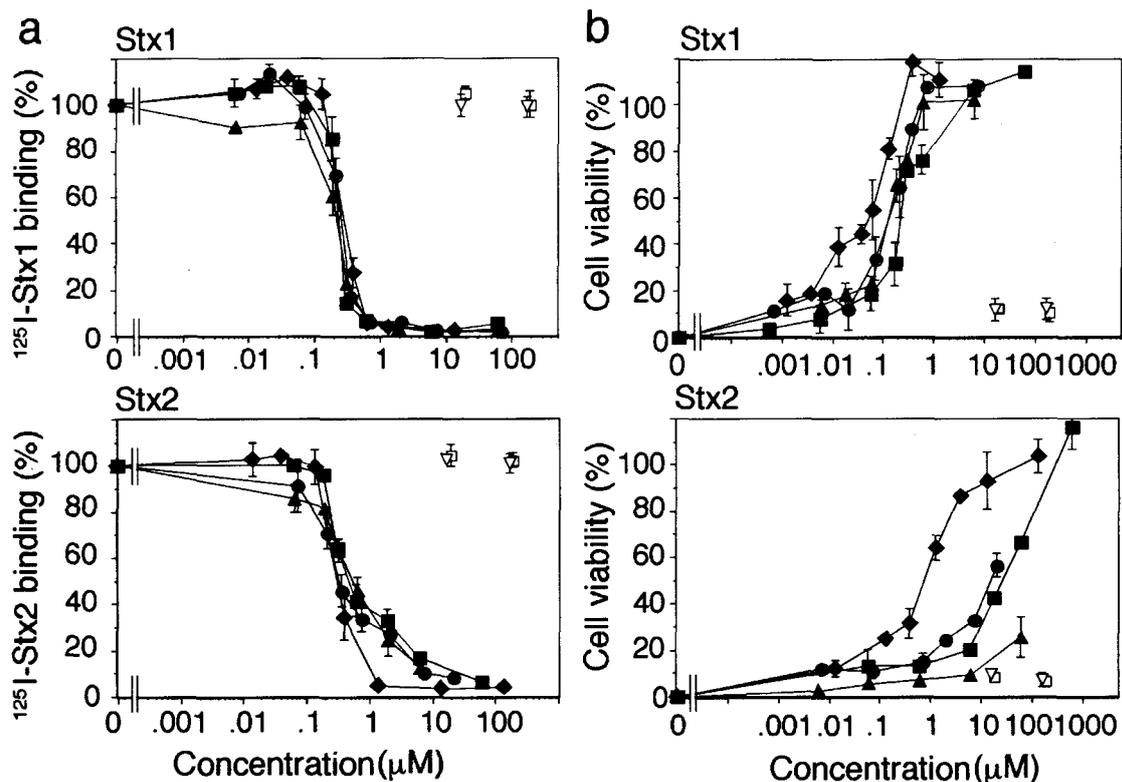


Fig. 6 Stx の生物活性に対する Gb3-polymers の阻害効果

ベロ細胞における a) Gb3-polymers の Stx1, Stx2 結合阻害効果 b) Gb3-polymers の Stx1, Stx2 細胞障害活性阻害効果 (◆; Gb3-polymer 1:0, ●; Gb3-polymer 2:17, ▲; Gb3-polymer 1:11, ■; Gb3-polymer 1:12, □; Lac-polymer 1:0, ▽; free trisaccharide.)

Gb3-polymer	IC ₅₀ (mean μM ± SE)			
	binding		cytotoxicity	
	Stx1 (n=4)	Stx2 (n=3)	Stx1 (n=3)	Stx2 (n=3)
1:0	0.33 ± 0.04	0.34 ± 0.05	0.05 ± 0.004	0.82 ± 0.16
2:17	0.33 ± 0.04	0.38 ± 0.07	0.16 ± 0.05	18.8 ± 4.6
1:11	0.25 ± 0.03	0.60 ± 0.13	0.14 ± 0.01	Not determined
1:12	0.33 ± 0.04	0.55 ± 0.13	0.30 ± 0.06	26.6 ± 3

Table 2 ベロ細胞における Stx1, Stx2 の結合、細胞障害活性に対する各 Gb3-polymer の 50% 阻害濃度

第四節 マウスを用いた O157:H7 感染実験

次に、Stx 産生 O157:H7 感染マウスを用いて、各 Gb3-polymer の感染致死性阻害効果を検討し、血清中及び糞便中の Stx2 量、Gb3-polymer 投与群マウス、及び非投与群マウスの脳組織変化を検討した。

4-1) マウスを用いた Stx 産生 O157:H7 感染実験を行った。O157:H7 を投与し、感染成立が確認される 3 日目から、各 Gb3-polymer を 1 回 0.5 mg、1 日 2 回、3 日間経口投与した。コントロールマウス 12 匹は全て、感染から 5 日目で神経症状を発症し、12 日までに死亡した (Fig 7)。一方、Gb3-polymer 1:0 投与群マウス 5 匹、及び Gb3-polymer 1:12 投与群の 4 匹中 3 匹が、30 日以上どの神経症状も併発せずに生存した。また、Gb3-polymer 2:17, 1:11 投与群も、それぞれ 2 匹中 2 匹とも 30 日以上生存し、Stx の致死性から免れた。以上の結果から、Gb3-polymer は *in vivo* の実験においても、O157:H7 感染の致死性を顕著に抑制することが明らかになった。また、感染成立が確認された後、Gb3-polymer を経口投与しても、その効果が現れることがわかった。

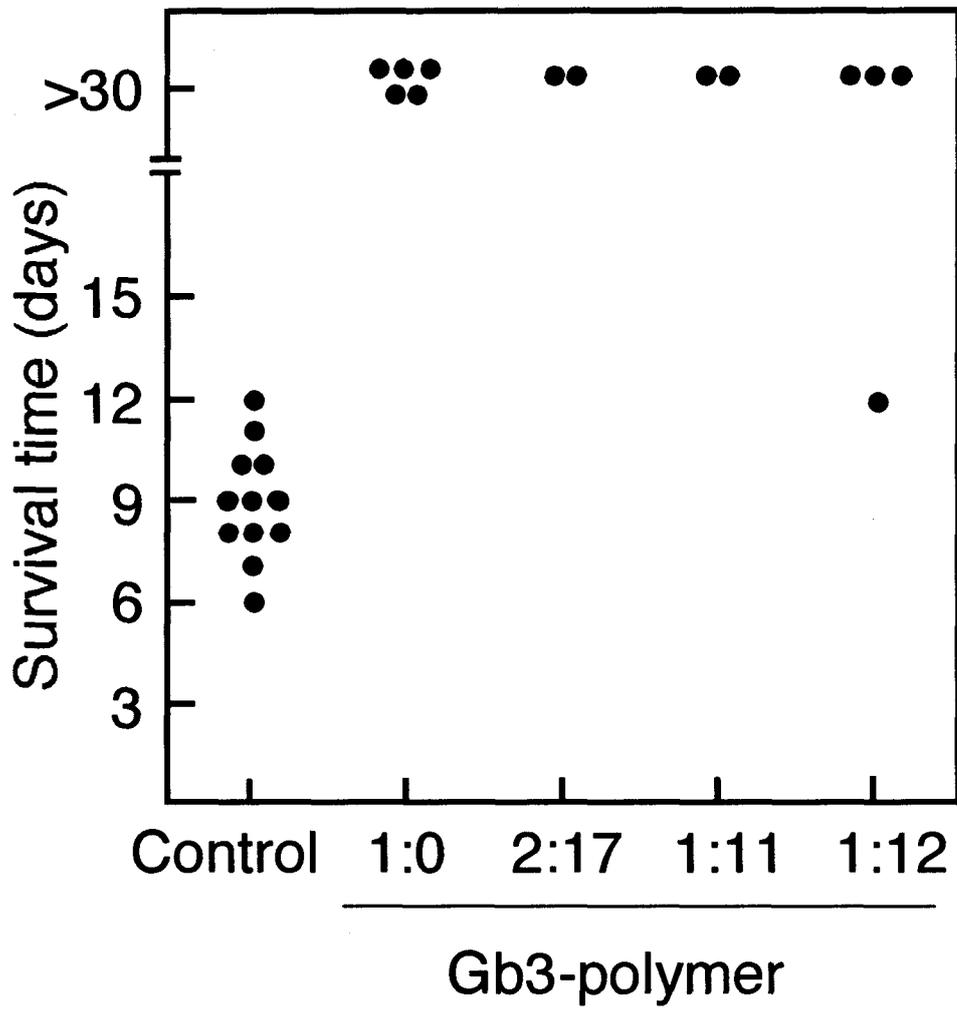


Fig. 7 マウス O157:H7 感染実験

4-2) 血清中或いは糞便中の Stx2 量を測定した。コントロール群では、O157:H7 投与後 4 日目に血清中の Stx2 濃度が最大に達するが、Gb3-polymer 1:0, 1:12 投与群では血清中の Stx2 量は 4 日目までに検出限界以下レベルにまで低下した (Table 3)。興味深いことに、糞便中の Stx2 量は、コントロール群に比べて Gb3-polymer 1:0, 1:12 投与群の約半分以下に低下していた。In vitro では、血清または糞便存在下でも、高濃度 Gb3-polymer が Stx2 検出に影響しないことを確認しているため、糞便中 Stx2 量の減少は Gb3-polymer 1:0 を投与することに起因していると考えられる。

Treatment	Mean concentration of Stx2 ±SE	
	stool, pg/ml (n=3)	serum, pg/ml (n=3)
Gb3-polymer		
1:0	25 ± 6	-
1:12	33 ± 5	-
Saline	71 ± 6	41 ± 6

Table 3. 血清中または糞便中の Stx2 量

4-3) O157:H7 感染症は脳障害を引き起こすことが知られているので、Gb3-polymer1:0 投与群及び非投与群のマウスの、大脳の組織変化を検討した。Gb3-polymer 非投与群マウスでは、感染後 5 日目で大脳皮質に細胞浸潤 (Fig. 8A)や出血 (Fig. 8B; 赤い点) が観察された。しかし脳幹におけるミエリンの脱落は見られなかった (Fig. 8 C; 薄紫がミエリン)。Gb3-polymer 1:0 投与群マウスの脳の組織では非投与群に見られるような細胞浸潤や出血は全く見られなかった (data not shown)。また非投与群マウスの海馬において、Stx2 の沈着が見られた (Fig 8D)。しかし、Gb3-polymer 1:0 投与群マウスでは Stx2 の沈着は全く見られなかった (Fig. 8E)。このことから、Gb3-polymer 1:0 は Stx2 の血清レベルを低下させ、脳への集積を阻害することで致死的な O157:H7 感染を顕著に抑制していることが明らかとなった。

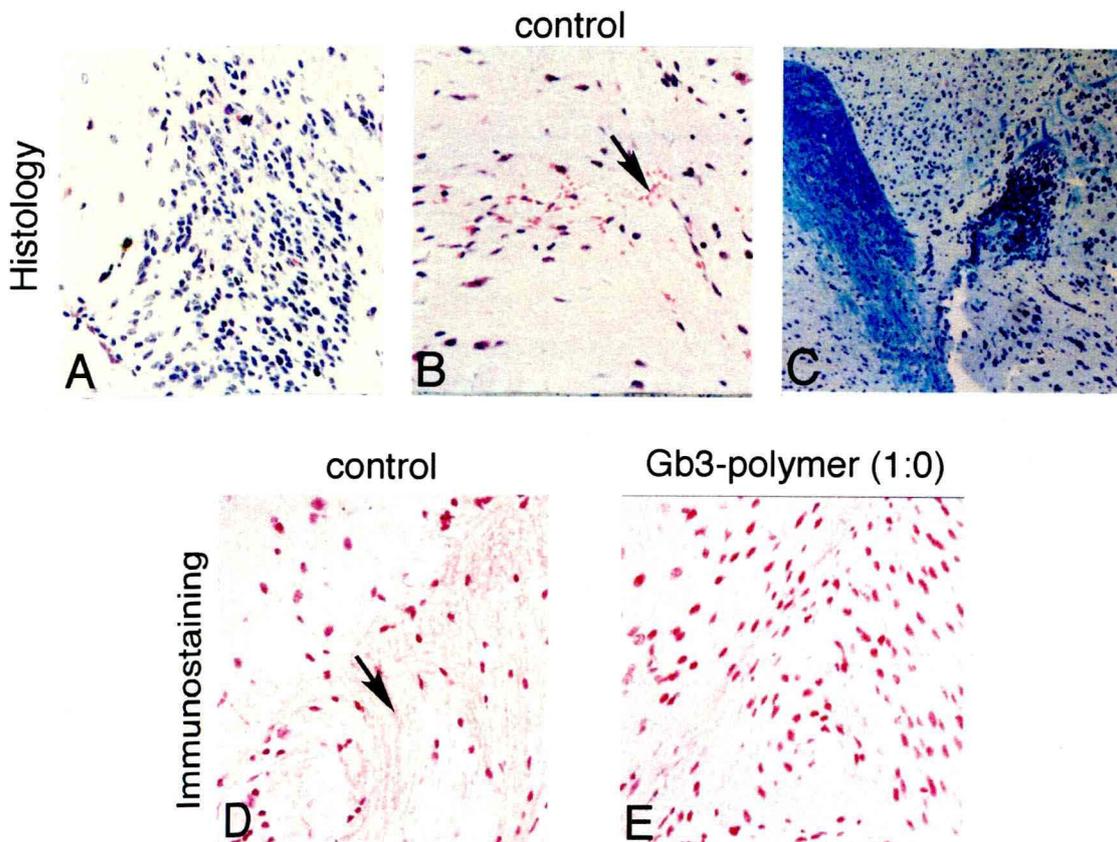


Fig. 8 マウスの脳組織変化と抗 Stx2 抗体による免疫染色

第五節 考察

本章では、ポリアクリルアミドを骨格とし、グロボ 3 糖を種々の密度に集積させた一連の Gb3-polymer を合成し、腸管で作用する Stx 吸着剤としての効果を検討した。

ポリマー上に高密度にグロボ 3 糖を集積させた Gb3-polymer 1:0 は、BIAcore による測定結果から、非常に高親和性に Stx1 BH, Stx2 BH と結合することが示された。また、Stx1, Stx2 の細胞への結合を低濃度で阻害すること、Stx1, Stx2 の細胞障害活性を低濃度で阻害することが示された。また、Stx1 と Stx2 が糖鎖を認識する際の、糖集積度の影響はそれぞれ異なっていることがわかった。Stx1 はポリマー上のグロボ 3 糖の集積度に影響を受けないのに対し、Stx2 は糖密度に依存して、Gb3-polymer への親和性が大きく変化した。従って Gb3-polymer と Stx2 が高親和性に結合するためには、ポリマー上の糖がより集積していることが重要であることが考えられた。このことは臨床において、重篤な合併症との関連が深いとされる Stx2 に対する Stx 吸着剤を開発するために、重要な知見であると考えられる。

Dohi らは、2002 年にポリアクリルアミドに芳香環のスペーサーを介してグロボ 3 糖が集積した化合物を合成したと報告している⁽¹⁹⁾。この化合物は、ポリマー上にグロボ 3 糖がおよそ 1:8 の割合で集積している。Stx に高感受性を示す ACHN 細胞 (ヒト腎癌由来細胞) に対する化合物の効果を検討したところ、Stx1 の毒素活性は顕著に阻害したが、Stx2 に対しては化合物の濃度が 100 μ M でも全く阻害効果を示さなかった。この化合物と Gb3-polymer の Stx2 に対する阻害効果に大きな違いが生じた原因は、主鎖とグロボ 3 糖をつなぐスペーサーの長さが異なっていた点にあると考えられる。芳香環をもつスペーサーは Gb3-polymer のスペーサーの約半分の長さであった。このことから、Stx2 と高親和性に結合するためにはポリマー上にグロボ 3 糖を高密度に集積させるだけでなく、長いスペーサーを有していることも非常に重要であることが考えられた。グロボ 3 糖を長さの異なるアルキル鎖で単分子層に結合させた実験系 (SAM) においても、Stx1 よりも Stx2 の方が Gb3-polymer と高親和性に結合するために長いアルキル鎖を必要とすることが報告されている⁽²⁰⁾。従って、Gb3-polymer の場合も Stx2 を効率的に阻害するためにスペーサーの長さが影響していると考えられる。

In vivo の実験において、Gb3-polymer を経口投与したマウスは O157:H7 感染による致死性を顕著に阻害し、血清中の Stx2 量がコントロールマウスに比べて明らかに減少していた。Gb3-polymer 1:0 と 1:12 の平均分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにより測定したところ、それぞれ 36 kD, 73 kD であった (data not shown)。どちらの化合物も、1 分子あたり約 50 個のグロボ 3 糖が集積している。これらのことから、Gb3-polymer は Stx2 と腸管で大きな複合体を形成し、Stx2 の血中への侵入を抑制し、血清中の Stx2 量が減少したのではないかと推測される。興味深いことに、糞便中の Stx2 量も Gb3-polymer を投与することによって減少していた。この原因は不明であるが、糞便中の Gb3-polymer は Stx2 の検出には影響しないことがわかっていることから、Gb3-polymer 投与群マウスの腸管における総 Stx2 量が減少している可能性が考えられる。このことについては今後、腸管における大腸菌からの Stx2 産生量を定量する必要がある。

これまでに、経口投与剤として合成された Stx 吸着剤 Synsorb-Pk は、STEC 感染マウスにおいて Stx による致死性を阻害することはできず、合成化合物で Stx 吸着剤となり得る化合物は開発されていなかった。しかし本研究において開発した Gb3-polymer は、経口投与で Stx1 だけでなく Stx2 に対しても顕著にその毒性を阻害することが示され、STEC 感染症治療薬として有用であると十分期待される。Gb3-polymer は水溶性に優れ、予防的に多くの人に簡単に投与できるメリットがある。さらに Gb3-polymer は、感染成立後に投与した場合においても効果があるため、予防的または対処的どちらの治療においても有効性があると考えている。

第三章 カルボシランデンドリマーを核構造とした Stx 中和剤の最適構造の同定

第一節 はじめに

第一章でも述べたように、これまでの研究から、種々の SUPER TWIGs の中で6つのグロボ3糖をもつ SUPER TWIG (1)6 が、血中で Stx 阻害作用を示すことが明らかとなり、SUPER TWIGs には Stx を血中でより効率的に阻害するための最適構造があると考えられた。そこで本研究では、新たに数種類の SUPER TWIGs を合成し、血中で最も効果的に作用するために必須な SUPER TWIGs の構造を同定することにした。

また、これまでに Ling らにより、グロボ3糖アナログと Stx 1B-subunit の共結晶化が報告されており⁽²¹⁾、Stx B-subunit 5 分子とグロボ3糖との複合的な結合には決まった結合様式があることが明らかとなっている (Fig 9)。すなわち、Stx1 B-subunit 1 分子あたりには、サイト1、サイト2、サイト3の3カ所 (Fig. 9 丸印)、5 量体では計 15 カ所のグロボ3糖結合サイトが存在している。また、各グロボ3糖結合サイトに変異を有する Stx B-subunit 変異体を用いた検討から、生理的な Gb3 と Stx1 B-subunit が高親和性に結合するためには、3種類のすべての結合サイトが必要であることもわかった⁽²²⁾。さらに、Stx1 の細胞障害活性における結合サイトの影響も検討したところ、サイト1と2に変異を有する Stx1 B-subunit 変異体では、野生型に比べて障害活性が $1/10^5 \sim 1/10^6$ 低下した。しかしサイト3に変異がある場合には、活性は $1/10$ の低下にとどまった。このことから、Stx1 が毒性を発揮するためには、生理的な Gb3 が Stx 1B-subunit のサイト1、2に結合し、サイト3はサイト1、2とグロボ3糖との高親和性結合を促進するように働いており、直接的に関与していない可能性が考えられた。Stx2 については、グロボ3糖との共結晶化の報告はされていないが、2004年に Stx2 の結晶構造解析の報告があり、Stx2 も Stx1 と同様のグロボ3糖結合サイトが存在していることが予想されている⁽²³⁾。このように、Stx B-subunit の3つのグロボ3糖結合サイトは、それぞれ固有の毒性発現のための役割を持つことが考えられた。

そこで本研究では、SUPER TWIGs と Stx1 B-subunit、Stx2 B-subunit が結合する際には、どのグロボ3糖結合サイトがどのように関与しているかを Stx B-

subunit 変異体を用いて検討し、SUPER TWIGs が血中で効率的に Stx の毒性を阻害するために必須な結合サイトを明らかにすることを試みた。

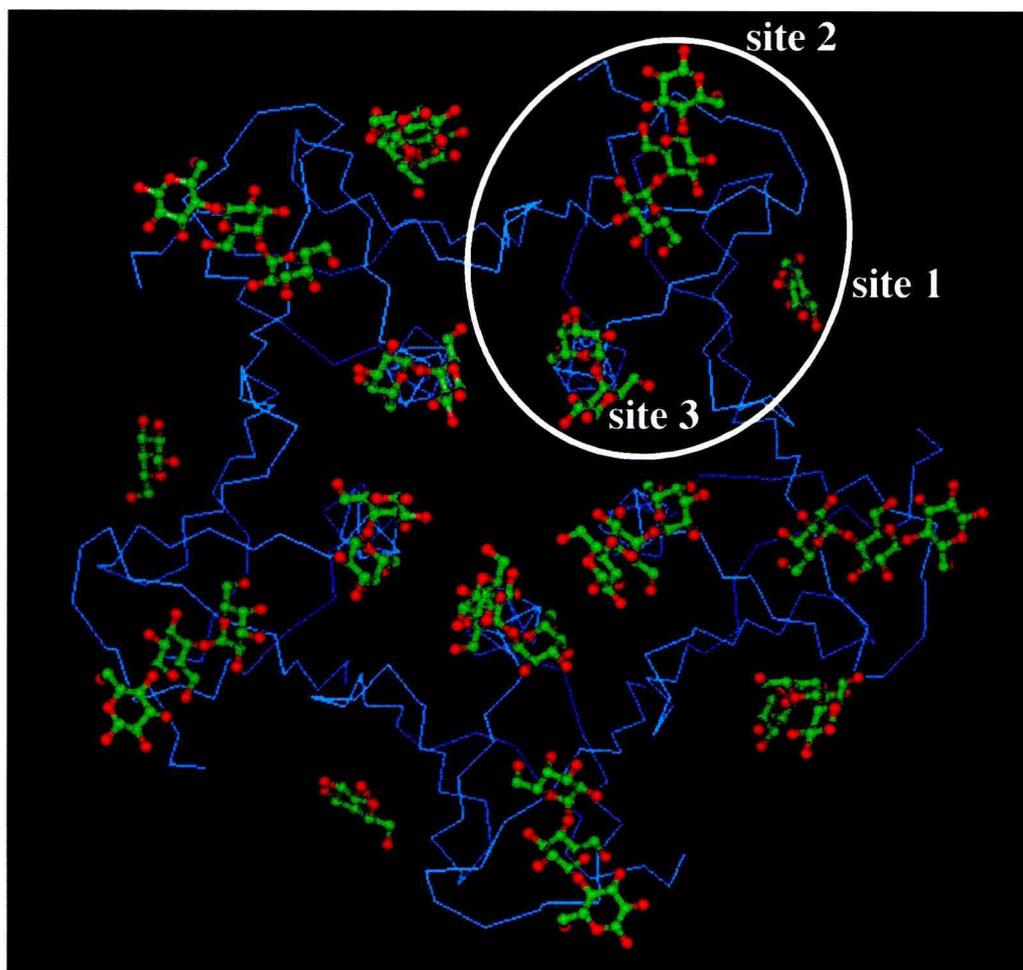
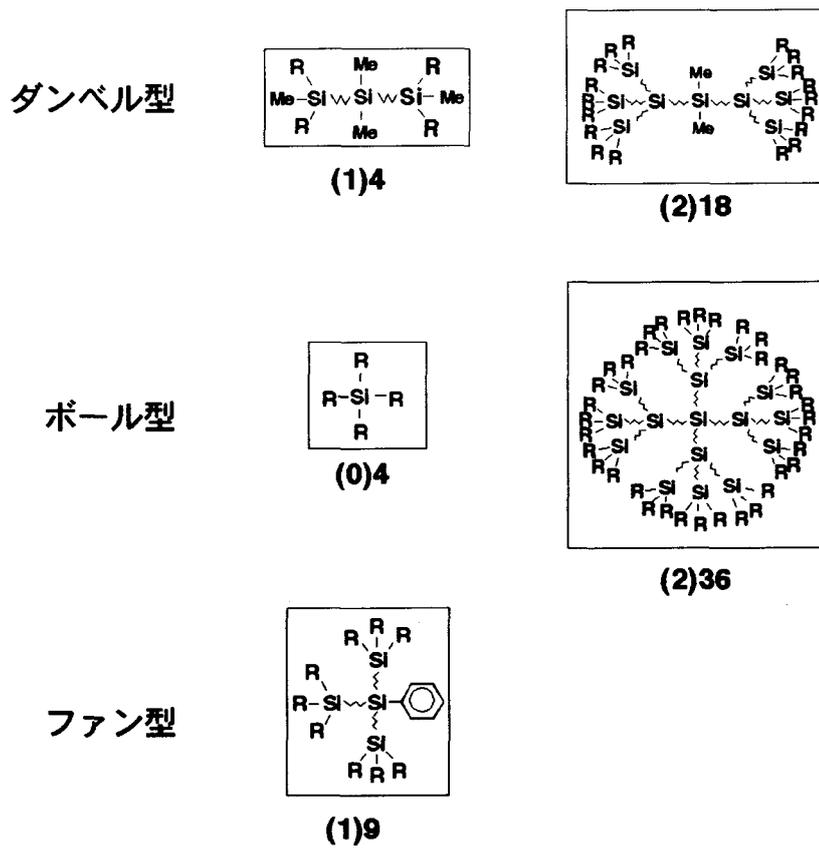


Fig. 9 Stx1 B-subunit の分子構造

第二節 血中で作用するための SUPER TWIGs の最適構造の決定

SUPER TWIGs の最適構造を決定するために、新たに Si 原子世代数、各 Si 原子に結合するグロボ 3 糖の数、中心の Si 原子から伸びるアームの数、を変えた SUPER TWIG ((1)4, (2)18 : ダンベル型、(0)4, (2)36 : ボール型、(1)9 : ファン型、と名付けた。) を作成した (Fig. 10)。各 SUPER TWIG について、Stx1 B-、及び 2 B-subunit に対する解離定数 (K_D 値) を His-tagged Stx1 B-subunit, Stx2 B-subunit (Stx1BH, Stx2BH) を用いて、BIAcore により測定し検討した。その結果、SUPER TWIG (1)4, (1)6, (1)9, (2)18, (2)36 と、Stx1BH, Stx2BH に対する K_D 値はいずれもほぼ同程度であった (Table 4)。このことから、SUPER TWIG 1 分子あたりのグロボ 3 糖数を 36 個まで増やしても、 K_D 値には影響しないことがわかった。また、SUPER TWIG (0)3, (0)4 については他の SUPER TWIGs と比べて非常に大きい K_D 値を示した (Table 4)。SUPER TWIG (0)4 と(1)4 のグロボ 3 糖数は同じであるが K_D 値は大きく異なっていた。このことから、SUPER TWIGs と Stx B-subunit が高親和性に結合するためには、グロボ 3 糖の数を増やすことよりも、Si 間にある程度の距離を持ち、グロボ 3 糖が両端に集合を作っていることが必要であることがわかった。



SUPER TWIGs

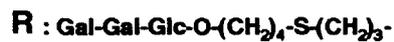


Fig. 10 SUPER TWIGs の構造

SUPER TWIGs	Stx1 B-subunit		Stx2 B-subunit	
	K _D (μM±SE)	RU _{max}	K _D (μM±SE)	RU _{max}
(0)3	195 ±29	1040 ±42	380 ±25	1070 ±45
(0)4	21 ±2.4	720 ±63	112 ±22	600 ±130
(1)4	0.41 ±0.08	980 ±103	0.90 ±0.12	880 ±85
(1)6	0.69 ±0.04	790 ±28	1.3 ±0.28	1240 ±18
(1)9	0.38 ±0.06	710 ±48	0.65 ±0.02	490 ±51
(1)12	0.29 ±0.03	800 ±59	1 ±0.19	820 ±68
(2)18	0.45 ±0.06	1100 ±82	0.57 ±0.06	970 ±71
(2)36	0.20 ±0.03	660 ±37	0.23 ±0.02	480 ±52

Table 4. SUPER TWIG の Stx1BH, Stx2BH に対する解離定数 K_D と最大結合量 (RU_{max})

次に、今回新たに作成した SUPER TWIGs のうち、SUPER TWIG (1)4, (1)9, (2)18, (2)36 は ^{125}I -Stx1, 及び ^{125}I -Stx2 のペロ細胞への結合を顕著に抑制した (Fig. 11 (a))。SUPER TWIG (1)4, (1)9, (2)18, (2)36 の IC_{50} は、 ^{125}I -Stx1 では、順に 0.43, 0.34, 0.21, 及び 0.21 μM 、 ^{125}I -Stx2 においては、順に 1.4, 11, 2.1, 及び 9.5 μM であった。SUPER TWIG (0)4 の IC_{50} は、Stx1, Stx2 ともに、他の SUPER TWIGs よりも明らかに高くなっていた。SUPER TWIG (1)6 の ^{125}I -Stx1, ^{125}I -Stx2 の IC_{50} 値 (0.33 μM , 3.5 μM) と比べ、共に低下していたのは SUPER TWIG (2)18 だけであった。

Stx1, Stx2 によるペロ細胞障害活性阻害効果については、SUPER TWIG (1)4, (2)18 の IC_{50} は、Stx1 についてはそれぞれ 0.19 μM , 0.18 μM であり、Stx2 については、それぞれ 0.52 μM , 0.26 μM であった (Fig. 11 (b))。また、SUPER TWIG (1)9, (2)36 については、Stx1 ではそれぞれ 26 μM , 17 μM 、Stx2 ではそれぞれ 18 μM , 19 μM であった。SUPER TWIG (0)4 には阻害活性は認められなかった。これらのことから、Stx1, Stx2 両方に対して阻害活性を示すためには、SUPER TWIG (1)4, (2)18, (1)6 にみられるように、疎水的な核構造をはさんで対称的にグロボ 3 糖の集合を作ることのできるダンベル型が適していることが明らかとなった。

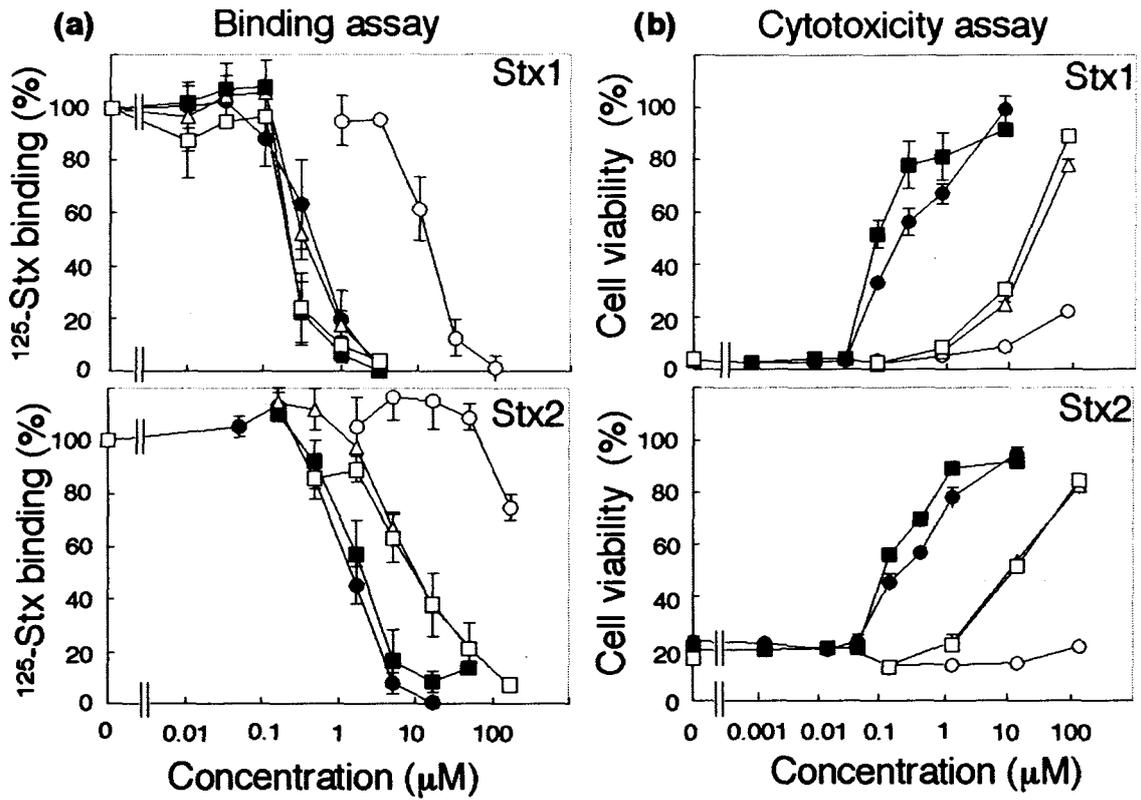


Fig. 11 Stx の生物活性に対する SUPER TWIGs の阻害効果

a) Stx のペロ細胞に対する SUPER TWIGs の結合阻害活性 b) Stx のペロ細胞への細胞障害活性に対する SUPER TWIGs の阻害効果 (○; SUPER TWIG (0)4, ●; SUPER TWIG (1)4, △; SUPER TWIG (1)9, ■; SUPER TWIG (2)18, □; SUPER TWIG (2)36)

次に、マウスに致死量の Stx2 (体重 1g あたり 0.25ng) と各 SUPER TWIG を静脈投与し、SUPER TWIGs の血中における Stx2 阻害効果を検討した。その結果、SUPER TWIG (2)18 のみが完全に血中 Stx2 を阻害し、その致死性を抑制した (Fig. 12)。コントロールの非投与群マウスでは 4 日以内に 11 匹全てのマウスが死亡したのに対し、SUPER TWIG (2)18 投与群では 2 ヶ月以上も延命した。SUPER TWIG (1)4 は、*in vitro* では Stx2 阻害作用を示していたが、*in vivo* のマウス感染実験においては、4 日以上生存したマウスは 7 匹中 1 匹だけであった。SUPER TWIG (1)6 にも十分な血中 Stx2 の阻害効果があることから⁽¹⁷⁾、SUPER TWIGs の構造は、ダンベル型であっても両端のグロボ 3 糖の数が 4 つより多くないと、*in vivo* における効果が得られないことがわかった。

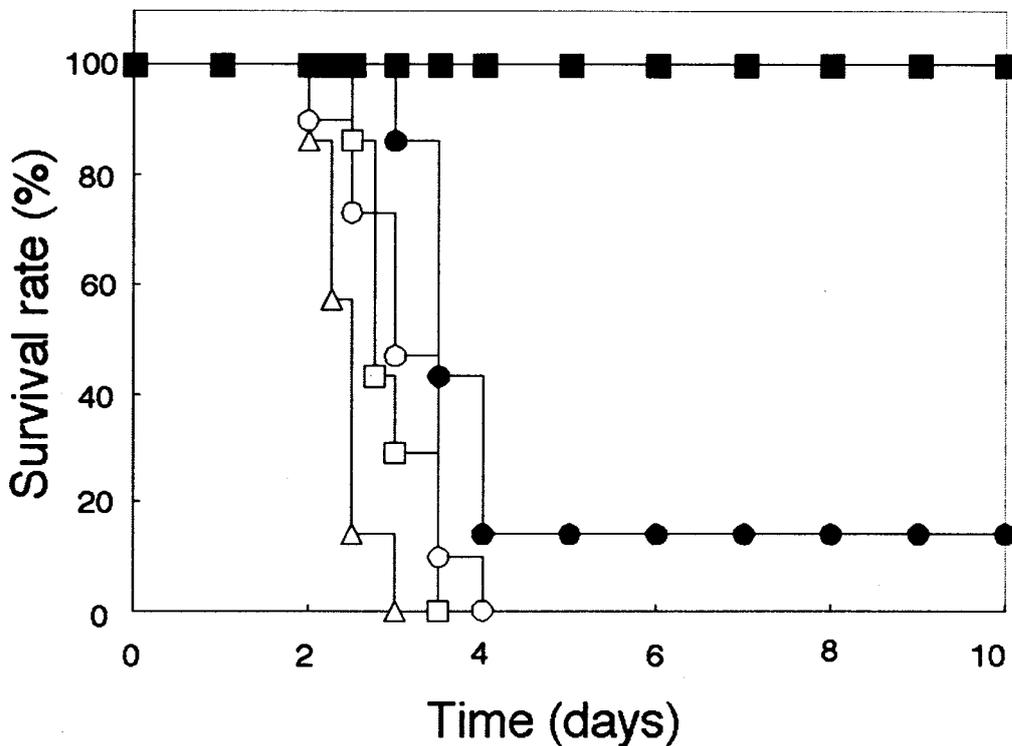


Fig. 12 致死量 Stx2 静脈投与マウスの SUPER TWIGs による阻害効果
 コントロール群(○ ; n=11)、SUPER TWIG (1)4 投与群 (●; n=7)、SUPER TWIG (1)9 投与群(△; n=7)、SUPER TWIG (2)18 投与群 (■; n= 8)、SUPER TWIG (2)36 投与群(□; n=7)

さらに、SUPER TWIGs のアルキル鎖と Si 原子からなる核構造の長さを検討するために、SUPER TWIG (1)₆ をもとに Fig. 13 に示すような一連の SUPER TWIGs を新たに作製した。これら SUPER TWIGs について、BIAcore を用いて測定し、Stx1BH, Stx2BH に対する K_D 値を算出した。その結果、SUPER TWIG (1)₂, (1)₃ の K_D 値は Stx1BH, Stx2BH とともに、SUPER TWIG (1)₄, (1)₅, (1)₆ よりも明らかに大きくなっていった (Table 5)。Fig. 12 に示した結果と同様に、この結果からも *in vitro* における Stx B-subunit との高親和性結合には 4 つ以上のグロボ 3 糖が必要であることが確認された。

次に、核構造中の Si 原子間に 2, 4, 5 個の炭素を有する SUPER TWIG (1)₂, (1)₄, (1)₅ の Stx1BH, Stx2BH に対する K_D 値を算出したところ、SUPER TWIG (1)₆ と比べ、いずれもほぼ同程度であった。また核に 4 つの Si 原子をもつ SUPER TWIG (1.5)₆ も、SUPER TWIG (1)₆ と同程度の K_D 値を示した。しかし、隣りあったグロボ 3 糖同士の距離が他のものより長い SUPER TWIG (2)₆' の K_D 値は Stx1BH では 64 μ M, Stx2BH では 50 μ M となり、結合親和性は著しく減少した (Table 5)。

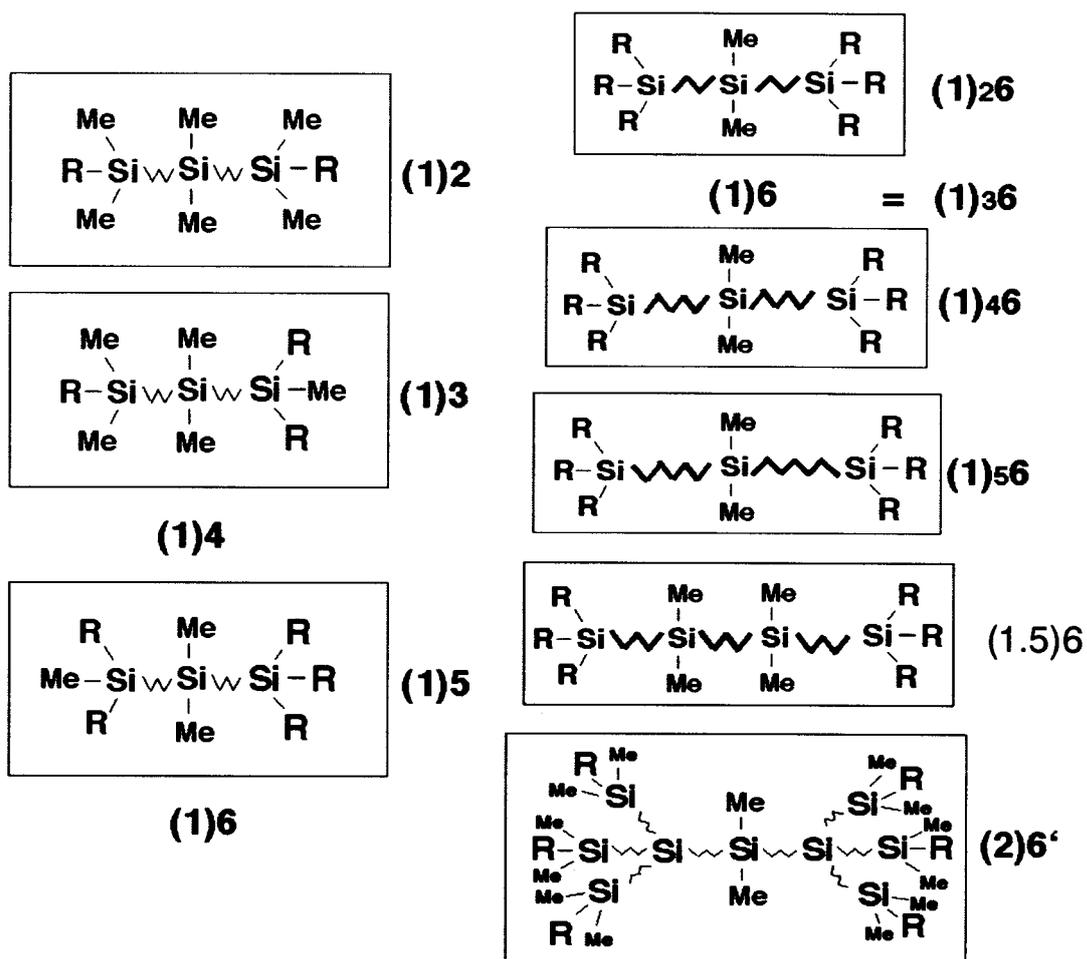


Fig. 13 SUPER TWIGs の構造

SUPER TWIGs	Stx1 B-subunit		Stx2 B-subunit	
	K_D ($\mu\text{M} \pm \text{SE}$)	RU_{max}	K_D ($\mu\text{M} \pm \text{SE}$)	RU_{max}
(1)2	88 ± 4.5	2170 ± 10	68 ± 4.5	2830 ± 55
(1)3	39 ± 2	1060 ± 25	29 ± 0.71	1400 ± 34
(1)5	3.7 ± 0.30	730 ± 71	3.8 ± 0.35	710 ± 33
(1) ₂ 6	2.4 ± 0.29	640 ± 78	2.6 ± 0.04	640 ± 14
(1) ₄ 6	1.4 ± 0.16	630 ± 49	1.1 ± 0.06	640 ± 28
(1) ₅ 6	1.6 ± 0.29	730 ± 38	1.3 ± 0.14	780 ± 87
(1.5)6	3.8 ± 0.39	690 ± 55	3.9 ± 0.30	820 ± 97
(2)6'	64 ± 3.7	1970 ± 76	50 ± 0.86	2630 ± 63

Table 5. SUPER TWIGs の Stx B-subunit に対する解離定数 (K_D)

致死量の Stx2 をマウスに静脈投与する実験において、SUPER TWIG (1)₄6, (1)₅6, (1.5)₆ は完全に Stx2 の毒性を抑制したが、SUPER TWIG(1)₂6 は減弱していた (Fig. 14)。これに対し SUPER TWIG (2)₆' は、Stx2 致死性の抑制は見られなかった。このことから、核構造の Si 原子間の距離は少なくとも 11 Å 必要で、両末端のグロボ 3 糖はある程度の糖鎖密度を保てるように、隣同士のグロボ 3 糖が近接していることが必要であることがわかった。

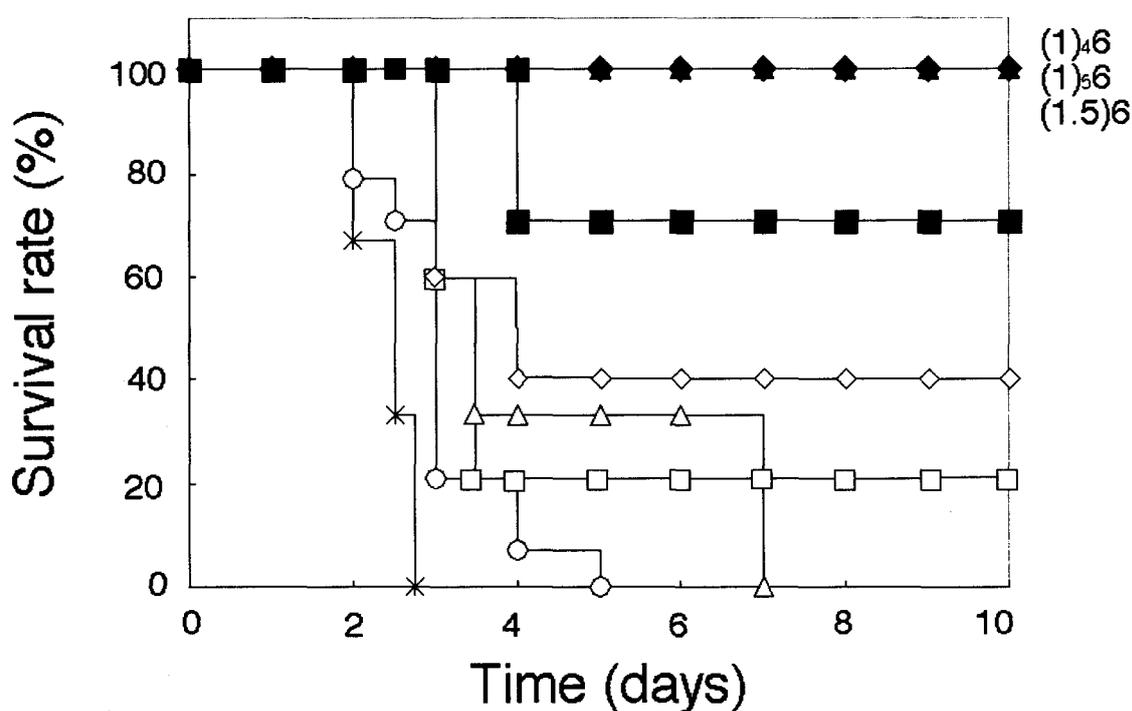


Fig. 14 致死量 Stx2 静脈投与マウスの SUPER TWIGs による阻害効果

コントロール群 (○; n=14)、SUPER TWIG (1)₂6 投与群 (□; n=5)、SUPER TWIG (1)₃6 投与群 (◇; n=5)、SUPER TWIG (1)₅6 投与群 (△; n=6)、SUPER TWIG (1)₂6 投与群 (■; n=7)、SUPER TWIG (1)₄6 投与群 (▲; n=7)、SUPER TWIG (1)₅6 投与群 (●; n=7)、SUPER TWIG (1.5)₆ 投与群 (◆; n=7)、SUPER TWIG (2)₆' 投与群 (*; n=6)

第三節 SUPER TWIG (2)18 のマクロファージによる Stx2 依存的な取り込みについて

これまでの研究より、SUPER TWIG (1)6 と Stx2 が複合体を形成すると、肝臓や脾臓などの網内系組織に存在するマクロファージへの取り込みが亢進することがわかっている⁽¹⁷⁾。そこで、ヒト単球系細胞 U937 細胞を用いて、各 SUPER TWIG 存在下、¹²⁵I-Stx2 の細胞内取り込みを検討した。その結果、SUPER TWIG (1)6 と (2)18 において ¹²⁵I-Stx2 の取り込みが亢進し、また ¹²⁵I-Stx2 取り込み量は SUPER TWIG (2)18 の方が亢進していた (Fig. 15)。さらに、Alexa 488 標識した Stx2 と SUPER TWIG (2)18 及び (2)36 の存在下、U937 細胞を 37℃、1 時間培養し、細胞内の局在を共焦点レーザー顕微鏡で確認したところ、SUPER TWIG (2)18 を共存させた細胞では、あきらかに Alexa-Stx2 (緑)の細胞内への取り込みが亢進していた (Fig. 16)。また、Alexa-Stx2 と lysosome マーカーの lysotracker (赤)がマージしていたことから、Alexa-Stx2 は lysosome に運ばれ、分解される可能性が考えられた。一方、SUPER TWIG (2)36 は、Stx2BH との高い親和性で結合していた (Table 2)にも関わらず、Alexa-Stx2 の細胞内への取り込みは減弱していた。Fig. 12 に示すように、今回作製した SUPER TWIGs のうち SUPER TWIG (2)18 のみが血中の Stx2 阻害作用を示したことから考えると、SUPER TWIG (1)6、(2)18 のような骨格をもつ化合物が Stx2 と複合体を作ると、マクロファージへの取り込みが亢進し、分解されることが考えられた。また、このマクロファージによる Stx2 の解毒メカニズムが、SUPER TWIGs が血中で効果を発揮するために必須であると考えられた。

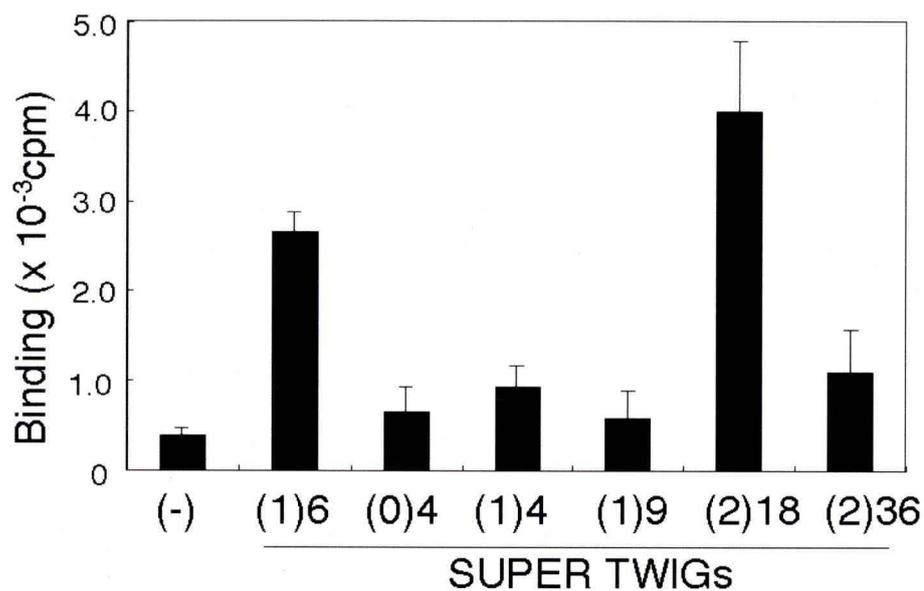


Fig. 15 U937 細胞の SUPER TWIGs 依存的な ¹²⁵I-Stx2 の取り込み

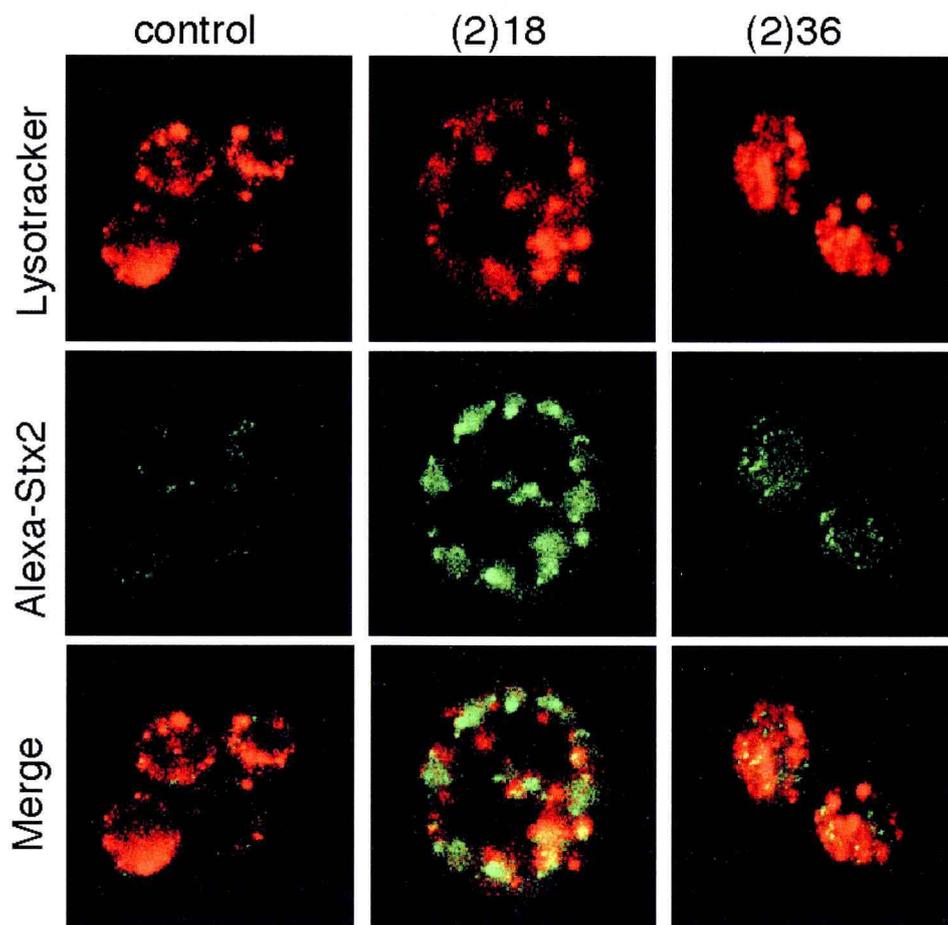
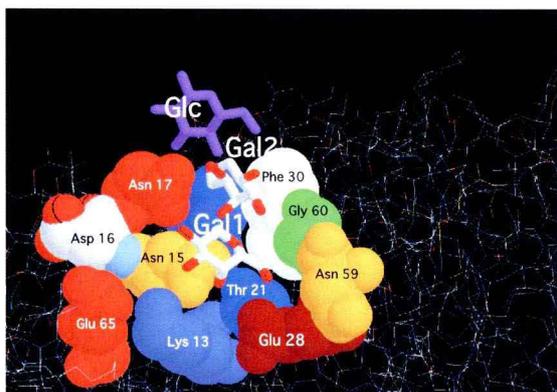


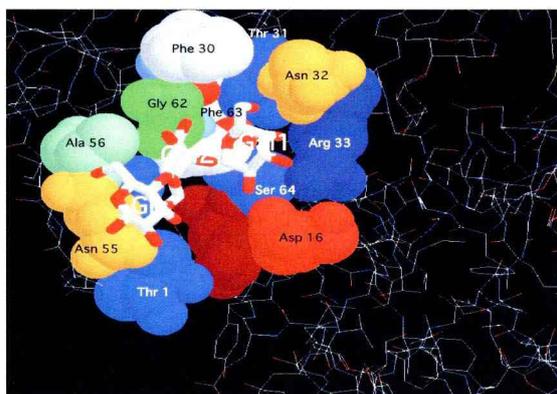
Fig. 16 Alexa-Stx2 の細胞内局在

第四節 SUPER TWIG (2)18 と Stx B-subunit のグロボ 3 糖結合サイトとの結合様式について

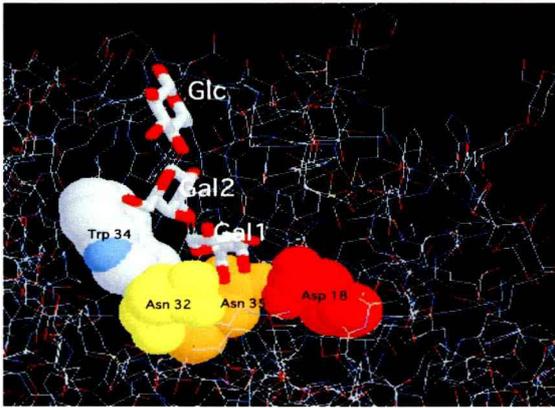
SUPER TWIG (2)18 と Stx B-subunit との結合様式を調べるため、Stx B-subunit のサイト 1, 2, 及び 3 の各グロボ 3 糖結合サイトに変異を有する一連の変異体を使用することにした。第一節でも述べたが、Ling らにより、Stx1 B-subunit とグロボ 3 糖との共結晶化が報告され、Stx1 B-subunit と Gb3 との結合に関与するアミノ酸が明らかになっている⁽²¹⁾。すなわち、サイト 1 では、グロボ 3 糖の Gal 1 は Thr 21, Glu 28, Gly 60 と水素結合をしている。Gal 2 は Phe 30 と疎水相互作用、Asp 17, Gly 60 と水素結合している。Glc は Phe 30 と疎水相互作用している (Fig.17 a)。サイト 2 では、Gal 1 は Phe 30, Thr 31, Gly 62, Ser 64, と疎水相互作用、Asp 16, Arg 33, Asn 32, Phe 63, と水素結合をしている。Gal 2 は Thr 1, Thr 54, Ala 56, Gly 62 と疎水相互作用、Asn 55 と水素結合をしている。Glc は Asn 55 と疎水相互作用をしている (Fig. 17 b)。サイト 3 では、Gal 1 は Trp 34 と疎水相互作用、Asp 18, Trp 34, Asn 35 と水素結合をしている。Gal 2 は Trp 34 と疎水相互作用をしている (Fig. 17 c)。



a) サイト 1



b) サイト 2 (Fig. 17)



c) サイト 3

Fig. 17 Stx1 B-subunit の各結合サイトとグロボ 3 糖の相互作用

また Soltyk らは、各サイトに関与するアミノ酸変異体を作成し、検討を行っている⁽²²⁾ので、これらを参考にし、本実験では Stx1 B-subunit のサイト 1 の Phe 30, Asp 17、サイト 2 の Ala 56, Gly 62、サイト 3 の Trp 34, Asp 18 を、他のアミノ酸に置換した Stx1 B-subunit 変異体をそれぞれ作成した。なお、Stx2 B-subunit はグロボ 3 糖との共結晶化がされていないので、Fraser らの Stx2 B-subunit の結晶構造解析と結合サイトへのグロボ 3 糖結合の予測結果⁽²³⁾を参考に、Stx1 B-subunit の各サイトに相当する Stx2 B-subunit のアミノ酸置換体を作成した。すなわち、サイト 1 は Asp 16, Trp 29、サイト 2 は Thr 55, Gly 61、サイト 3 は Trp 33, Asp 17 を他のアミノ酸に置換した。

まず、各 Stx B-subunit 変異体をキャラクタライズするために、ペロ細胞への ¹²⁵I-Stx 結合活性を 50 倍量の各 Stx B-subunit (WT1BH, WT2BH)、及び変異体との競合実験により確認した。Stx1 B-subunit では D17E, F30A は約 20%、G62A, W34A は約 40%、A56Y は約 60% が ¹²⁵I-Stx1 と競合したのに対し、D18E および F30A/ G62A/ W34A のトリプルミュータントはほとんど競合せず、¹²⁵I-Stx1 の結合に影響しなかった (Fig 18)。従って、Stx1 の標的細胞への結合には全ての結合サイトが関与していると考えられた。次に Stx2 B-subunit では、T55Y は約 70%、G61Y は約 55%が ¹²⁵I-Stx2 と競合し、D15E, W29A, W33A、W29A/ G61A/ W33A のトリプルミュータントはほとんど ¹²⁵I-Stx2 の結合に影響しなかった。このことから、Stx2 の標的細胞への結合にはサイト 1, 3 が関与していることが考えられた。サイト 2 については、Stx2 と標的細胞の結合に関与していない、或いは、今回選択したアミノ酸は細胞膜上のグロボ 3 糖との相互作用に必須で

はない、のいずれかであることが考えられた。

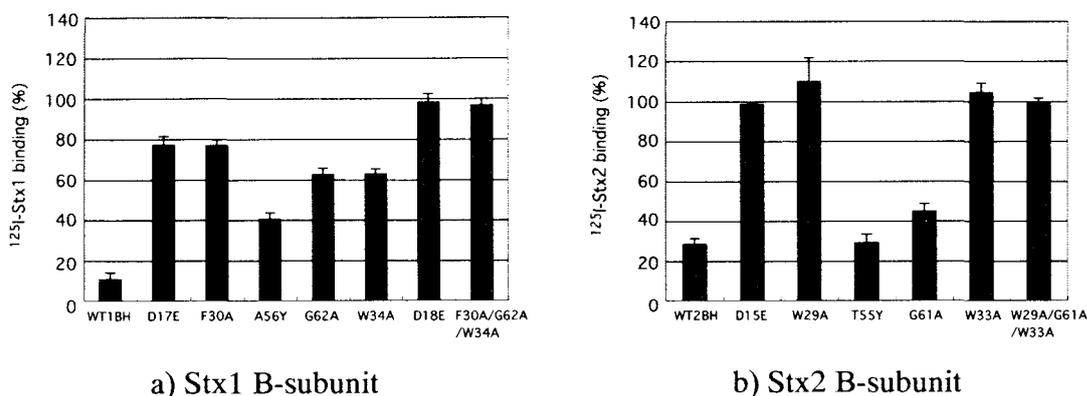


Fig. 18 ベロ細胞への ¹²⁵I-Stx 結合に対する 50 倍量 Stx B-subunit 変異体競合実験

次に、Gb3 と生体膜主要構成成分であるホスファチジルコリンを 1:24 (モル比) の割合で混合した vesicle の K_D 値を BIAcore により測定した。その結果、野生型の Stx1BH, 及び 2BH に対する K_D 値は 2.1, 及び 13 $\mu\text{g/ml}$ であった (Table 6)。次に、Stx1BH 変異体に対する K_D 値を測定したところ、サイト 2 のミュータントである A56Y 以外のすべてのシングルポイントミュータントに対する K_D 値が大きくなっていった。従って、Gb3 と Stx1 B-subunit との結合には全てのグロボ 3 糖結合サイトが必要であるということが本実験からも確認された。なお、A56Y の K_D 値は野生型 (WT1BH)と同程度で、変異による Gb3 への結合の影響に変化はなく、G62A とは異なっていた。このことは、Fig. 18 a) において ¹²⁵I-Stx1 の標的細胞への結合に対する 50 倍量の A56Y による競合拮抗作用が減弱していることと一致していた。

一方で、Stx2BH のサイト 2 のシングルポイントミュータントの K_D 値は野生型とほぼ同じであり、これらのアミノ酸は Gb3 との結合には影響していないことがわかった。これに対しその他のサイト 1, 3 のシングルポイントミュータントの K_D 値はいずれも大きくなっていった。この結果から、Stx 2 B-subunit と Gb3 の結合にサイト 1, 及び 3 が重要な役割を果たしており、サイト 2 は結合に影響していないことが示された。従って、Stx1 と Stx2 の Gb3 への結合の仕方は大きく異なっていることが考えられた。

Gb3 in lipid vesicle				
Site	Stx1B-subunit	K _D (μg/ml)	Stx2 B-subunit	K _D (μg/ml)
1	Wild type	2.1	Wild type	13
	D17E	26	D16E	>500
	F30A	37	W29A	>500
2	A56Y	3.5	T55Y	5.7
	G62A	10	G61A	9.6
3	W34A	11	W33A	>500
	D18E	47	D17E	>500

Table 6. Stx B-subunit 変異体に対する Gb3 vesicle の解離定数 (K_D)

SUPER TWIG (2)18 の結合については、Stx1BH のすべてのシングルポイントミュータントの K_D 値に大きな影響が見られなかった。しかし、サイト 3 を含むダブルミュータントまたはトリプルミュータントの K_D 値はいずれも大きくなった (Table 7)。サイト 1, 2 両方に変異が導入され、サイト 3 はインタクトな状態のダブルミュータント (D17E+G62A, F30A+G62A) では野生型と同程度の K_D 値で結合していた。このことから、Stx1 B-subunit では、サイト 3 或いは、サイト 1+2 の 2 カ所が SUPER TWIG (2)18 との高親和性結合に必須であると考えられた。

一方で、Stx2BH ではサイト 3 のポイントミュータント (W33A, D17E) と SUPER TWIG (2)18 との結合親和性が低下していた (Table 7)。また、サイト 1, 2 のダブルミュータントは、SUPER TWIG (2)18 に対し野生型と同程度の親和性で結合していた。このことから、Stx2 B-subunit のサイト 3 が SUPER TWIG (2)18 との高親和性結合に必須であると考えられた。

SUPER TWIG (2)18				
Site	Stx1B-subunit	K_D (μM)	Stx2 B-subunit	K_D (μM)
1	D17E	0.60	D16E	0.54
	F30A	0.45	W29A	0.24
2	A56Y	0.32	T55Y	0.36
	G62A	0.35	G61A	0.26
3	W34A	0.86	W33A	54
	D18E	2.7	D17E	29
1+2	D17E/G62A	0.53	D16E/G61A	0.71
	F30A/G62A	0.36	W29A/G61A	0.45
1+3	D17E/W34A	60		
	F30A/W34A	— ^a	W29A/W33A	— ^a
2+3	G62A/W34A	— ^a	G61A/W33A	>50
1+2+3	D17E/G62A/W34A	98		
	F30A/G62A/W34A	>150	W29A/G61A/W33A	— ^a

Table 7. Stx B-subunit 変異体に対する SUPER TWIG (2)18 の解離定数 (K_D)
—^a ; 結合なし

第五節 考察

本研究では、一連の SUPER TWIGs を作製し、血中において Stx2 阻害作用を示すための SUPER TWIGs の最適構造を同定した。その結果、以下の3つの条件が必須であることがわかった (Fig. 19)。

1. ダンベル型の骨格を有し、両端にグロボ3糖のクラスターをもち、疎水性核構造の間の距離は少なくとも 11 Å 必要である。11 Å 以下の場合、*in vitro* では Stx B-subunit と高親和性に結合するが、*in vivo* では効果がない。
2. ダンベル型の両端のグロボ3糖の数は、*in vivo* で効果を示すには、片側3個以上、全体で6個以上必要である。グロボ3糖の数が4つの場合は、*in vitro* において、Stx B-subunit と高親和性に結合するにとどまり、*in vivo* では効果がない。
3. 分岐点となる Si 原子とグロボ3糖の間の距離は末端の糖鎖密度を保つために、10 Å 以内である必要がある。

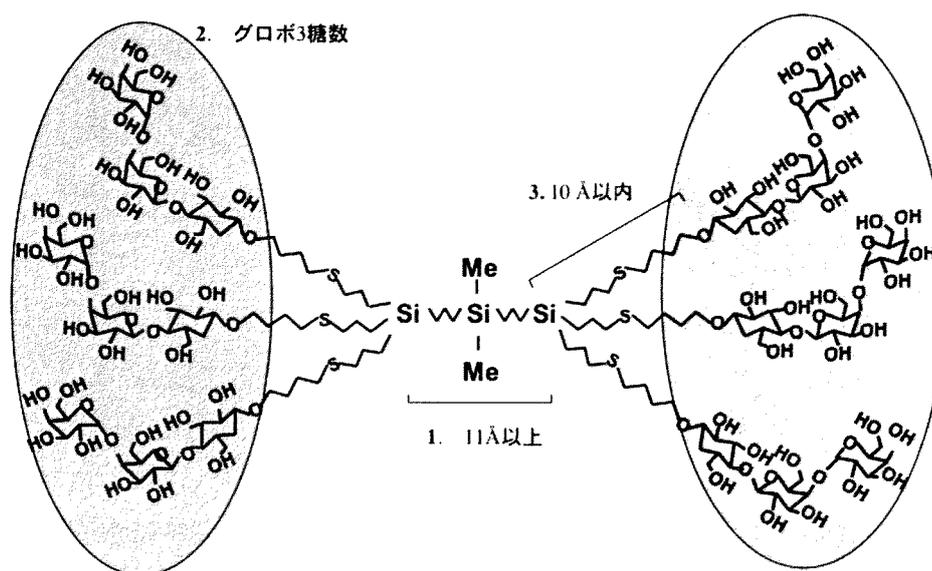


Fig. 19 SUPER TWIG の最適構造

上記に示した条件1と2の構造は、*in vitro* においては Stx の阻害活性に必ずしも必要ではないことが示された。しかし、Fig. 15、及びこれまでの我々の

グループの報告⁽¹⁷⁾から、SUPER TWIGs が Stx2 と複合体を形成し、その複合体がマクロファージに認識され、取り込まれて分解されるためには、条件 1 と 2 は必須であると考えられる。

また、SUPER TWIG (2)6' は、条件 1 と 2 の構造を満たしているにも関わらず、*in vitro* においても Stx1BH, Stx2BH に対する結合親和性が低かった。このことから条件 3 の構造は、Stx の中和活性に必須なものであると考えられる。

SUPER TWIG (2)18 はこれら三つの条件を全て満たす構造をもっており、*in vivo* において最も効果のある Stx 中和剤になると考えられる。

また、Stx1BH, Stx2BH のグロボ 3 糖結合サイトに変異を導入したシングル、ダブル、トリプルミュータントを用いた実験では、SUPER TWIG (2)18 が Stx1 B-subunit と結合する際にはサイト 3 またはサイト 1+2、Stx2 B-subunit との結合にはサイト 3 が必須であることを示した。Stx2 B-subunit については、グロボ 3 糖と Stx2 B-subunit 複合体の共結晶化が未だに報告されていないため、Stx2 の結晶構造解析の報告⁽²³⁾ からグロボ 3 糖との結合に必要なアミノ酸を予測し、そのアミノ酸置換体を用いて、グロボ 3 糖との結合の関与を推測した。その結果、Stx2 BH のサイト 3 ミュータント (W33A, D17E) と、Gb3 および SUPER TWIG (2)18 との K_D 値は、ともに顕著に高値であった。このことから、グロボ 3 糖の機能的な活性はサイト 3 にあることが考えられる。従って、サイト 3 は、Stx 中和剤開発の効果的なターゲットになることが示唆された。

また、SUPER TWIG (1)6, (1)12, (2)36 についても各 Stx2 B-subunit 変異体との結合親和性を検討したところ、SUPER TWIG (2)18 と同様、いずれの SUPER TWIGs もサイト 3 の Stx2 B-subunit ポイントミュータント (W33A, D17E) との結合親和性が低下し、サイト 1+2 の Stx2 B-subunit ダブルミュータントとの結合親和性は野生型と同程度であった (data not shown)。従って、SUPER TWIGs はボール型でも Stx2 B-subunit とサイト 3 を介して結合していることが示され、結合様式は SUPER TWIGs の型によらないことがわかった。しかしながら、ボール型の SUPER TWIG (1)12、及び SUPER TWIG (2)36 は致死量 Stx2 投与マウスの致死性を阻害しなかった (Fig.12)。このことから、SUPER TWIGs が Stx2 の毒性を抑制するためには、サイト 3 に結合することが必須だが、それだけでは不十分で、ダンベル型でその両端にグロボ 3 糖を集積させた SUPER TWIGs が核構造の中心から折り曲がるようにしてグロボ 3 糖がサイト 3 に強固に結合することが重要であると考えられる。このように結合することにより SUPER

TWIGs の疎水性に富んだ核構造の領域が露出し、それをマクロファージが認識し、取り込み分解が促進するのではないかと考えられた。

なお、Gb3-polymer についても、同様に最適構造の同定を行った (24)。Gb3-polymer のアクリルアミド骨格とグロボ 3 糖をつなぐスペーサーを約 3 分の 1 の長さにした Gb3-polymer 1:17s を新たに合成し (Fig. 20)、Stx 結合親和性および Stx 結合阻害活性、Stx 細胞毒性阻害効果を Gb3-polymer 1:0, 2:17, 1:12 と比較検討した。また、His-tagged Stx B-subunit 変異体を用いて各 Gb3-polymer との結合親和性を BIAcore を用いて検討した。

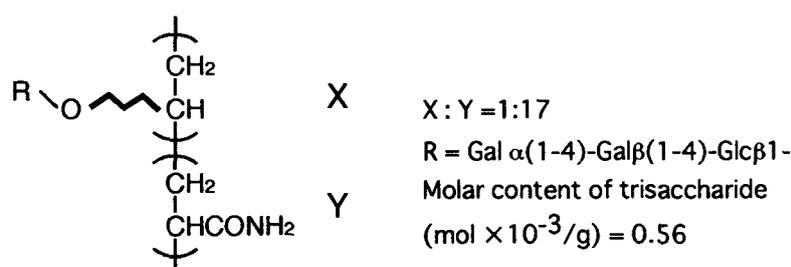


Fig. 20 Gb3-polymer 1:17s の構造

その結果、Gb3-polymer 1:17s は Stx1 B-subunit に対し、他の Gb3-polymers と同程度の親和性で結合していたが、Stx2 B-subunit についてはポリマー上の糖密度が低下するに従って 6 倍から 60 倍に親和性が低下していた。最大結合量 (RU_{max}) も他の Gb3-polymers の約半分であった。このことからスペーサーの長さは、Gb3-polymer が Stx2 と高親和性に結合するのに特に重要であり、Stx1 との結合には影響しないことが示された。また、ベロ細胞における Gb3-polymers の Stx 結合阻害効果、Stx 細胞障害活性阻害効果を検討した場合においても、Gb3-polymer 1:17s の Stx2 に対する阻害活性は大きく低下しており、このことから Gb3-polymers の Stx2 阻害作用はスペーサーの長さの影響を受けていることが示された。

また、His-tagged Stx B-subunit 変異体を用い、Gb3-polymers と Stx B-subunit の結合親和性を検討した結果、Stx1BH については、Gb3-polymer 1:0 は、3 カ所のグロボ 3 糖結合サイトの各シングルミュータント、及びサイト 1+2, 1+3 のダブルミュータントに対して野生型とほぼ同程度の K_D 値を示した (Table 8)。サイト 2+3 のダブルミュータントと結合サイト 3 カ所すべてに変異が導入された

トリプルミュータントは、結合が大きく低下していた。従って、Gb3-polymer 1:0 が Stx1 B-subunit と高親和性に結合するには、サイト 2 またはサイト 3 のどちらかがあれば十分であると考えられた。また、Gb3-polymer 2:17 と Gb3-polymer 1:12 については、サイト 2 のシングルミュータントとの結合親和性が低下していた。さらに、サイト 1+3 のダブルミュータント (D17E/W34A) との K_D 値は野生型と同程度であった。つまり、ポリマー上の糖鎖密度を下げても、サイト 2 がインタクトであれば高親和性に結合することがわかった。このことから、Gb3-polymer と Stx1 B-subunit との結合には、サイト 2 が重要な役割をはたしていることがわかった。また、スペーサーの短い Gb3-polymer 1:17s では、サイト 2 シングルミュータント、サイト 1+2, 2+3 ダブルミュータント、トリプルミュータントに対して結合が見られなかったことから、他の Gb3-polymers と同様にサイト 2 を介して結合しており、結合サイトの選択性にはスペーサーの長さは影響しないことが分かった。

Gb3-polymer			1:0	2:17	1:12	1:17s
			K_D (μ M)	K_D (μ M)	K_D (μ M)	K_D (μ M)
wild type			0.34	0.44	0.60	0.4
mutated site			intact			
site1	D17E F30A	2+3	2.1 0.94	0.75 1.6	0.50 0.95	0.80 4.7
site2	A56Y G62A	1+3	0.88 1.4	7.5 13	18 4.4	— ^a — ^a
site3	W34A D18E	1+2	0.40 0.61	0.75 0.58	0.47 0.23	0.70 0.56
site1+2	D17E/G62A F30A/G62A	3	1.3 1.7	19 — ^b	6.3 20	— ^a — ^a
site1+3	D17E/W34A F30A/W34A	2	0.82 2.3	0.34 — ^b	0.55 — ^a	0.21 — ^a
site2+3	G62A/W34A	1	— ^a	— ^a	— ^a	— ^a
site1+2+3	D17E/G62A/ W34A	—	— ^a	— ^a	— ^a	— ^a
	F30A/G62A/ W34A	—	— ^a	— ^a	— ^a	— ^a

Table 8. Gb3-polymers と His tagged Stx1 B-subunit 変異体の結合親和性

 ; 野生型 B-subunit の K_D 値と同程度のもの

—^a ; 結合なし、—^b; 飽和しない

また、Stx2 B-subunit については、Gb3-polymer 1:0 では各シングルミュータントに対して野生型とほぼ同程度の K_D 値で結合し、サイト 1+2 のダブルミュータント以外の他のダブルミュータントには結合親和性が大きく低下していた (Table 9)。このことから、ポリマー上に高密度にグロボ 3 糖を集積させた場合はサイト 3、またはサイト 1+2 を介して結合していることが分かった。Gb3-polymer 1:12, 2:17 については、サイト 2 のシングルミュータントに対する K_D 値は野生型と変化がなく、その他のミュータントに対する結合親和性が大きく低下していた。このことから、ポリマー上のグロボ 3 糖密度が下がると、サイト 1+3 を介した結合をしていることが明らかとなった。また、Gb3-polymer のスペーサーの長さは Stx2 B-subunit の結合サイトの選択性に影響しなかった。

Gb3-polymer			1:0	2:17	1:12	1:17s
			K_D (μ M)			
wild type			0.68	1.4	7.1	41
mutated site		intact				
site1	D16E	2+3	0.93	50	— ^b	— ^a
	W29A		0.93	47	— ^b	— ^a
site2	T55Y	1+3	0.73	0.60	0.60	18
	G61A		0.71	0.52	0.13	13
site3	W33A	1+2	1.8	87	— ^b	— ^a
	D17E		1.0	4.6	— ^a	— ^a
site1+2	W29A/G61A	3	1.5	84	— ^b	— ^a
	D16E/G61A		2.0	— ^b	— ^a	— ^a
site1+3	W29A/W33A	2	— ^a	— ^a	— ^a	— ^a
site2+3	G61A/W33A	1	12	— ^b	— ^a	— ^a
site1+2+3	W29A/G61A/ W33A	—	69	141	— ^a	— ^a

Table 9. Gb3-polymers と His tagged Stx2 B-subunit 変異体の結合親和性

■ ; 野生型 B-subunit の K_D 値と同程度のもの

—^a ; 結合なし、—^b; 飽和しない

以上のことをまとめた図を Fig. 21 に示す。Gb3-polymer が Stx1 と結合するためには、スペーサーの長さは影響せず、サイト 2 を介して結合することが重要である。また、Stx2 に対しては、スペーサーの長さが結合親和性に大きく影響するため、Gb3-polymer 1:17s よりも長いスペーサーを持っていることが必須となる。そしてサイト 1+3 を介していれば、糖鎖密度を下げてでも高親和性に結合する。第二章 Fig. 7 のマウス感染実験において Gb3-polymer 1:12 が顕著に O157 感染による致死性を抑制していたことから、少なくとも 1:12 の糖鎖密度でも十分な効果が得られる。

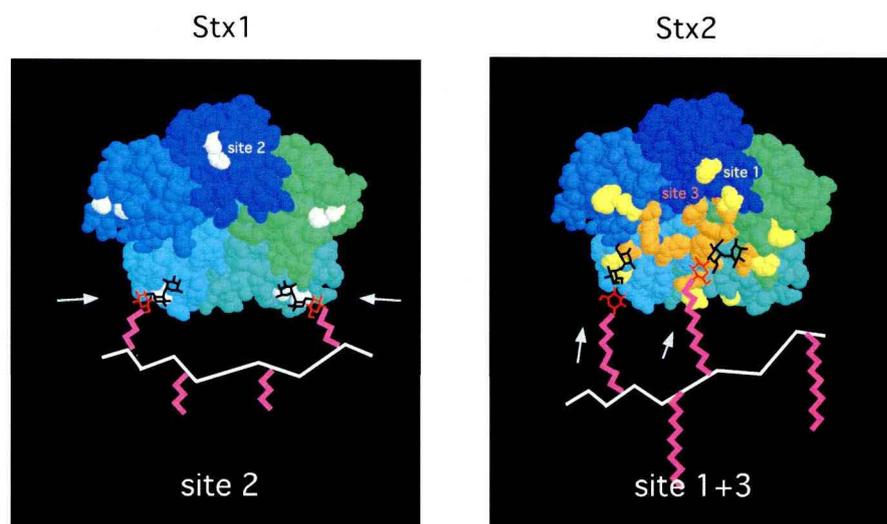


Fig. 21 Gb3-polymer と Stx B-subunit の結合様式の模式図

以上のように、SUPER TWIGs および Gb3-polymers の Stx 阻害作用発現のための必要最適構造を明らかにしたことで、今後臨床的に症状の重篤化と深く関係する Stx2 に対して、従来よりもはるかに低いコストで、より強力な阻害剤を開発することができると考えられる。

第四章 総括

本研究において、第一章では経口投与型の Stx 吸着剤 Gb3-polymer の開発、第二章では、静脈投与型 Stx 中和剤 SUPER TWIGs の血中 Stx 2 を効率的に阻害するための最適構造の同定を行った。

第一章では、ポリアクリルアミドを骨格とし、グロボ 3 糖を種々の密度で集積させた Gb3-polymer を用い、*in vitro* において、Stx1 だけでなく臨床上重要視されている Stx2 に対しても高親和性に結合し、低濃度で Stx の細胞への結合を阻害し、Stx 細胞障害活性を効率よく阻害することを示した。さらに、マウスの O157:H7 感染実験において、Gb3-polymer を経口投与したマウスは O157 感染による致死性を顕著に抑制することを示した。従って、Gb3-polymer は経口投与型の O157 感染症治療薬として臨床応用が期待できると考えられる。

第二章では、カルボシランデンドリマーを骨格とし、血中で作用するグロボ 3 糖を集積させた SUPER TWIGs の最適構造を同定した。また、一連の SUPER TWIGs を新たに合成し、血中での Stx2 阻害効果を指標にして SUPER TWIGs の構造活性相関を検討した。その結果、最適構造の条件として、中央に疎水性核構造を持ち、両端にグロボ 3 糖を集積したダンベル型であること、グロボ 3 糖は片側に 3 個、全部で 6 個以上は必要であること、分岐点の Si 原子とグロボ 3 糖の間の距離は 10 Å 以内であること、核構造の Si 原子間の距離は 11Å 以上であること、が挙げられた。また、マクロファーが Stx と SUPER TWIGs の複合体を認識し、取り込み、分解されることがわかっているが、マクロファーは SUPER TWIGs の中でも、ダンベル型で、グロボ 3 糖を 6 つ以上集積させているタイプに限って認識していることが明らかとなった。これらの条件を満たした SUPER TWIG (1)6 と(2)18 は、マクロファーによる取り込み促進活性が観察された。また、SUPER TWIG (1)6, (2)18 のみが血中で強く Stx2 阻害活性を示したことから、マクロファーが関与する Stx 分解機構も Stx2 阻害作用に大きく寄与していることが考えられた。さらに、Stx B-subunit 変異体を用いた検討から SUPER TWIG (2)18 と Stx1 との結合にはサイト 3 またはサイト 1+2 が高親和性結合に必須であり、SUPER TWIG (2)18 と Stx2 との結合にはサイト 3 が必須であることがわかった。このことから、サイト 3 は Stx2 の毒性発現に重要な役割を果たしていると考えられ、従ってサイト 3 は Stx 阻害剤の有効なターゲットになりうることが示唆される。

1996 年に大規模な集団発生が起こり、腸管出血性大腸菌感染者数は 17877

人と報告された。それ以降、毎年 3000~4000 人の O157 感染者が発生しており、2005 年 11 月現在の感染者数は 3447 名であり、全く減少の傾向は見られていない。しかしながら現在でも治療はホスホマイシンなどの抗生物質の投与であり、いまだ有効な治療薬は存在していない。SUPER TWIGs と Gb3-polymers は、それぞれ血中と腸管において、Stx1 だけでなく Stx2 の毒性も抑制する有効な O157 感染症治療薬になると考えられる。また、抗生物質の投与は菌体自体を破壊する一方、菌体内に貯まっていた毒素を大量に放出させてしまう危険があるが、これら化合物を抗生物質と併用することにより、より効率的に Stx の毒性を阻害することができ、抗生物質の使用の幅が広がると期待できる。

謝辞

本研究に際し、終始ご指導ご鞭撻を賜り、本論文を御校閲頂きました国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部名取泰博部長、西川喜代孝室長に謹んで感謝の意を表します。

また、終始本研究を御指導頂き御助言を賜りました埼玉大学工学部機能材料工学科松岡浩司助教授、奈良県立医科大学細菌学教室喜多英二教授、星薬科大学鮫島勇次名誉教授、星薬科大学病態機能制御学研究室高橋典子教授、星薬科大学生物資源研究室矢ノ下良平講師、に深く感謝致します。

また、本研究にあたり、御指導ならびに御助言を頂きました星薬科大学微生物学教室辻勉教授、星薬科大学衛生化学教室福井哲也教授に深く感謝致します。

最後に、数々のご協力を頂いた猪飼桂様をはじめ、国立国際医療センター研究所臨床薬理研究室、星薬科大学病態機能制御学研究室、生物資源研究室の皆様にご心より感謝致します。

実験の部

1. 材料

Gb3-polymer, SUPER TWIGs は、埼玉大学工学部機能材料工学科松岡浩司先生より授与された。遊離グロボ3糖は協和発酵工業より授与された。Stx1, Stx2 発現プラスミドは国立国際医療センター研究所山崎信二先生、浜端崇先生より授与された。

2. ベロ細胞の培養

ベロ細胞 (アフリカミドリザル腎由来細胞)は、10% FCS を含む DMEM (GIBCO) 培地で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。Stx 結合阻害実験、細胞毒性実験では、細胞を 0.25% の Trypsin-EDTA (GIBCO) ではがし、HBSS (GIBCO)で洗浄し、24 または 96 well のプラスチックのマイクロプレートに、翌日コンフルエントまたはサブコンフルエントになるようにまいた。

3. His-tagged Stx B-subunit の作成

各 Stx B サブユニットの C 末端に 6×His を融合させたリコンビナント His-tagged Stx B サブユニット (Stx1BH, Stx2BH) を作成した。Stx1 および Stx2 発現プラスミド (pUC118, pCH283) を用いた。Table 9 に示したプライマーを使用し、Stx B-subunit の cDNA を PCR 増幅し、末端に NcoI-BamHI の制限酵素認識部位を導入した。NcoI-BamHI を用いて制限酵素処理した StxB-subunit の cDNA 断片を pET-28a ベクター (Novagen) へ組み込んだ。

Stx1	NcoI site	5'-AGAGCCATGGCGACGCCTGATTGTGTA ACT-3'
	BamHI site	5'-AGAGGGATCCGCACGAAAATAACTTCGCT-3'
Stx2	NcoI site	5'-AGAGCCATGGATTGTGCTAAAGGTAAAATT-3'
	BamHI site	5'-AGAGGGATCCGCGTCATTATTA ACTG-3'

Table 10 使用したオリゴヌクレオチド

4. Stx1BH, Stx2BH 部位特異的変異体の作成

QuikChange Kit (Stratagene) を用いた。部位特異的変異オリゴヌクレオチドは Table 10 に示した。プラスミドは pET-28a-1BH, pET-28a-2BH を用いた。各ミューテーションの確認は、ダイデオキシ法を用いた。すべての変異体の B-subunit ペンタマーの確認は、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより行った。各 Stx B-subunit 変異体の結合活性は、¹²⁵I-Stx1 または ¹²⁵I-Stx2 との競合実験により確認した。方法は、ベロ細胞を 24 well plate に一晩培養後、¹²⁵I-Stx 1 µg/ml と 50 µg/ml の Stx B-subunit を加え、4℃、1 時間培養したのち、0.1% BSA を含む Hank's 溶液で洗浄後、lysis solution (0.1M NaOH, 0.5% SDS) を 200 µl 加え、細胞を溶解し ¹²⁵I-Stx の結合量を γ-カウンターにより測定した。

B-subunit mutants	oligonucleotides
1BH-D17E	ATACAAAATATAATGATGAAGATACCTTTACAGTTAAA
-F30A	AGTGGGTGATAAAGAATTAGCGACCAACAGATGGAATCTT
-A56Y	TGTAACCATTA AAACTAATTACTGTCATAATGGAGGGGGA
-G62A	TGCCTGTCATAATGGAGGGGCATTCAGCGAAGTTATTTTT
-W34A	AGAATTATTTACCAACAGAGCGAATCTTCAGTCTCTTCT
-D18E	ACAAAATATAATGATGACGAAACCTTTACAGTTAAAGTGG
-D17E/G62A	D17E primer and G62A primer
-F30A/G62A	F30A primer and G62A primer
-D17E/W34A	D17E primer and W34A primer
-F30A/W34A	TAAAGAATTAGCGACCAACAGAGCGAATCTTCAGTCTCTT
-G62A/W34A	G62A primer and W34A primer
-D17E/G62A/W34A	D17E primer, G62A primer and W34A primer
-F30A/G62A/W34A	F30A/W34A primer and G62A primer
2BH-D16E	TTTCCAAGTATAATGAGGAGGACACATTTACAGTGAAGGT
-W29A	GGTTGACGGGAAAGAATACGCGACCAGTCGCTGGAATCTG
-T55Y	TGTCACAATCAAAATCCAGTTACTGTGAATCAGGCTCCGGA
-G61A	TACCTGTGAATCAGGCTCCGCATTTGCTGAAGTGCAGTTT
-W33A	AGAATACTGGACCAGTCGCGCGAATCTGCAACCGTTACTG
-D17E	TCCAAGTATAATGAGGATGAAACATTTACAGTGAAGGTTG
-D16E/G61A	D16E primer and G61A primer
-W29A/G61A	W29A primer and G61A primer
-W29A/W33A	GGTTGACGGGAAAGAATACGCGACCAGTCGCGCGAATCTG (W29A/W33A primer)
-G61A/W33A	G61A primer and W33A primer
-W29A/G61A/W33A	W29A/W33A primer and G61A primer

Table 11. 使用した部位特異的変異オリゴヌクレオチド

5. His-tagged Stx B-subunit の調製

作成した発現プラスミドで大腸菌 BL21DE (3) (Novagen) を形質転換した。形質転換した BL21DE (3)は、30 $\mu\text{g/ml}$ のカナマイシン (Nacalai Tesque) を含む 1L の Luria-Bertani broth (Difco) 培地に 37°C で培養した。その後 1.0 mmol/L IPTG (Wako) を加え 4 時間、37°C で培養した。回収したペレットを 6000 U/ml のポリミキシン B (Sigma) を含む PBS 10 ml に懸濁し、遠心分離した後、上清に Ni^{2+} -charged resin (Novagen) を 100 μl 加え、2 時間、4°C で培養した。ビーズをよく洗浄後、elution buffer (1 M imidazole, 500 mM NaCl, 80 mM Tris-HCl ; pH 7.9) を加え、25°C、5 分間インキュベートし、Stx1BH, Stx2BH を溶出した。

6. Alexa Fluor 488 -labeled Stx2

Protein labeling kit (Molecular Probes 社) を用いて標識した。Stx2 100 μg に NaHCO_3 を加え、Alexa Fluor488 1mg と 1 時間、室温、遮光で反応させた。その後、1M グリシンを加え、BioGel P-30 (Bio-Rad) を充填したカラムでゲル濾過により溶出した。タンパク濃度は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により確認した。

7. SUPER TWIGs の固定化 Stx B-subunit への結合親和性

Nitrilotriacetic acid (NTA) センサーチップ (BIAcore) を用いた。Stx1BH または Stx2BH (10 $\mu\text{g/ml}$) を NTA チップ上に Ni^{2+} を介して固定し、各濃度のポリマーを流し (流速 20 $\mu\text{l/min}$ 、温度 25°C)、結合量を測定した。解離時間は Inject 終了から 3 分とした。得られたセンサーグラムからスキャッチャードプロットにより K_D を算出した。Gb3 含有 vesicle は PC 10 $\mu\text{g/ml}$ と Gb3 1 $\mu\text{g/ml}$ を混合し、窒素で溶媒を除去後、eluent buffer 400 μl (HEPES 10 mM, EDTA 50 μM , NaCl 150 mM, Tween 20 0.005%) に溶かし、透明になるまでソニケートした。

8. ^{125}I -Stx 結合阻害実験

ベロ細胞を 24 well plate 中に 37°C で一晩培養し、各 SUPER TWIG と ^{125}I -Stx1, ^{125}I -Stx2 (1 $\mu\text{g/ml}$) を加え 4°C、1 時間培養し、0.1% BSA を含む Hank's 溶液でよく洗浄後、lysis solution (0.1M NaOH, 0.5% SDS) を 200 μl 加え、細胞を溶解し γ -カウンターにより ^{125}I -Stx 量を測定した。

9. Stx 細胞障害活性阻害効果

ベロ細胞を 96 well plate 中、37°Cで一晩培養し、各 SUPER TWIG と Stx1 または Stx2 (10 pg/ml) 存在下、37°C、72 時間培養した。その後、Hank's 溶液で洗浄し、11 倍希釈した WST 試薬 (Wako) を加え、37°C、1 時間培養し、プレートリーダー (BIORAD) により吸光度 (450 nm) を測定した。

10. マウスへの Stx2 静脈投与

5-14 週齢雌の ICR マウス(18-20g ; Japan SLC) を用いた。マウスに SUPER TWIG と致死量の Stx2 (体重 1 g あたり 0.25 ng) を尾静脈投与した。動物の取り扱い、国立国際医療センター研究所動物実験指針に基づき行った。解析は Kaplan-Meier survival analysis または Fisher's exact test により行った。

11. マクロファージによる ¹²⁵I-Stx2 とりこみ

U937 細胞を 24 well plate にまいて一晩培養し、SUPER TWIG (10 μg/ml) 存在下、¹²⁵I-Stx2 (1 μg/ml) を加え 37°C、30 分培養した。その後 Hank's 溶液でよく洗浄し、lysis solution (0.1 M NaOH, 0.5% SDS) を 200 μl 加え、チューブに回収し、放射活性を γ-カウンターで測定した。

12. 共焦点レーザー顕微鏡

U937 細胞を glass base dish (IWAKI) にまき、一晩培養した。SUPER TWIG (10 μg/ml) 存在下、Alexa 488-Stx2 (1 μg/ml) と LysoTracker (0.3 μmol/L ; Molecular Probes) を加え、37°C、1 時間培養した。PBS で洗浄し、メディウムを加え、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 ; Carl Zeiss) を用いてそれぞれの細胞内局在を観察した。

13. マウスの O157:H7 感染実験

奈良県立医科大学細菌学教室喜多英二先生に、マウスの O157:H7 感染実験、血中および糞便中の Stx2 量の測定、脳の組織免疫染色を依頼した。本実験では、SPF3 週令雌 C57LBL/6 マウス (チャールズリバー社) を用いた。2 週間、マウスに低栄養食 (5 %タンパク食) を与え、5 週令に Stx1, Stx2 両産生菌 N-9 株 O157:H7 を経口的に感染させた (Kurioka, T 2002, Carbohydrate Research, 337, 983-989)。低タンパク食は感染後も与えた。感染マウス 8 匹に、

0.1 ml PBS で溶かした Gb3-polymer 25 $\mu\text{g/g}$ 体重 は、3 日目から 1 日 2 回、3 日間経口投与した。感染マウス 15 匹には、コントロールとして 0.1 ml の PBS に溶かした vesicle を処置した。解析は Kaplan-Meier survival analysis、または Fisher's exact test により行った。また、本系では、3 日目から血中の Stx 濃度が増加し、4 日目でピークとなる。そこで感染から 4 日目、各処置群の感染マウス 3 匹を屠殺し、血中および糞便中の Stx2 量を測定した。採血法は眼静脈採血、または心臓採血により行った。血中、糞便中 Stx2 量は ELISA (Bio-Rad Laboratories) (Kurioka T, Infect Immun 1998, 66, 1726-34) により測定した。コントロールには、未感染マウスの糞便、または血清中に Stx2 を混合したものをを用いた。糞便試料は PBS に懸濁し (50 mg/ml) ホモジナイズ後、ELISA 試薬の dilution buffer で 5 倍希釈した。血清試料は限外濾過により 20 倍に濃縮し、各サンプル 20 μl を dilution buffer と混合した。脳組織および免疫組織の実験は、Gb3-polymer 投与群またはコントロールマウス 5 匹を用いた。コントロールは感染 4 日目、Gb3-polymer 投与群は感染 30 日目にマウスを屠殺し、脳を 10%ホルムアルデヒドで固定した。組織観察は、パラフィン切片を作成し、Hematoxylin and eosin 染色、Alcian blue 染色、LFB 染色した。Stx2 の検出は monoclonal Stx2 抗体を用いた。動物の取り扱いについては、奈良県立医科大学動物実験指針に従い行った。

引用文献

- 1) Karmali MA, Steele BT, Petric M and Lim C. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet*, 1, 619-620 (1983).
- 2) Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, 308, 681-685 (1983).
- 3) O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.*, 51, 206-220 (1987).
- 4) Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11, 450-479 (1998).
- 5) Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N and Kobayashi JM. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J. Infect. Dis.*, 160, 994-998 (1989).
- 6) Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD, Samuel JE. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect. Immun.*, 61, 3392-3402 (1993).
- 7) Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem.*, 171, 45-50 (1988).
- 8) Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman EJ. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28S RNA when microinjected into *Xenopus* oocyte. *J Biol. Chem.*, 264, 596-601 (1989).
- 9) Stein PE, Boodhoo A, Tyrrell GJ, Brunton JL, Read RJ. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature*, 355, 748-750 (1992).
- 10) Kitov PI, Sadowska JM, Mulvey G, Armstrong GD, Ling H, Pannu NS, Read RJ, Bundle DR. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature*, 403, 669-672 (2000).
- 11) Armstrong GD, Fodor E, Vanmaele R. Investigation of Shiga-like toxin binding to chemically synthesized oligosaccharide sequences. *J Infect. Dis.*, 164, 1160-1167

- (1991).
- 12) Armstrong GD, Rowe PC, Goodyer P, Orrbine E, Klassen TP, Wells G, MacKenzie A, Lior H, Blanchard C, Auclair F. A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis.*, 171, 1042-1045 (1995).
 - 13) Trachtman H, Cnaan A, Christen E, Gibbs K, Zhao S, Acheson DW, Weiss R, Kaskel FJ, Spitzer A, Hirschman GH, Investigators of the HUS-SYNSORB Pk Multicenter Clinical Trial. Effect of an oral Shiga toxin –binding agent on diarrhea associated hemolytic uremic syndrome in children : a randomized controlled trial. *JAMA.*, 290, 1337-1344 (2003).
 - 14) Paton AW, Morona R, Paton JC. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat Med.*, 6, 265-270 (2000).
 - 15) Mulvey GL, Marcato P, Kitov PI, Sadowska J, Bundle DR, Armstrong GD. Assessment in mice of the therapeutic potential of tailored, multivalent Shiga toxin carbohydrate ligands. *J Infect Dis.*, 187, 640-649 (2003).
 - 16) Matsuoka K, Terabatake M, Esumi Y, Terunuma D, Kuzuhara H. Synthetic assembly of trisaccharide moieties of globotriaosyl ceramide using carbosilane dendrimers as cores. A new type of functional glyco-materials. *Tetrahedron Lett.*, 40, 7839-7842 (1999).
 - 17) Nishikawa K, Matsuoka K, Kita E, Okabe N, Mizuguchi M, Hino K, Miyazawa S, Yamasaki C, Aoki J, Takashima S, Yamakawa Y, Nishijima M, Terunuma D, Kuzuhara H, Natori Y. A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 99, 7669-7674 (2002).
 - 18) Miyagawa A, Kurosawa H, Watanabe T, Koyama T, Terunuma D, Matsuoka K. Synthesis of glycoconjugate polymer carrying globotriaose as artificial multivalent ligand for Shiga toxin –producing *Escherichia coli* O157: H7. *Carbohydrate Polymers.* 57, 441-450 (2004).
 - 19) Dohi H, Nishida Y, Takeda T, Kobayashi K. Convenient use of non-malodorous thioglycosyl donors for the assembly of multivalent globo- and isoglobosyl trisaccharides. *Carbohydr Res.* 337, 983-989 (2002).
 - 20) Miura Y, Sasao Y, Dohi H, Nishida Y, Kobayashi K. Self-assembled monolayers of

globotriaosylceramide (Gb3) mimics: surface-specific affinity with shiga toxin. *Anal Biochem.*, 310, 27-35 (2002).

- 21) Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL, Read RJ. Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry*. 37, 1777-1788 (1998)
- 22) Solyk AM, MacKenzie CR, Wolski VM, Hiramata T, Kitov PI, Bundle DR, Brunton JL. A mutational analysis of the globotriaosylceramide-binding sites of verotoxin VT1. *J Biol. Chem.*, 277, 5351-5359 (2002)
- 23) Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, James MN. Structure of shiga toxin type 2(Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol. Chem.*, 279, 27511-27517 (2004).
- 24) Watanabe M, Igai K, Matsuoka K, Miyagawa A, Watanabe T, Yanoshita R, Samejima Y, Terunuma D, Natori Y, Nishikawa K. Structural analysis of the interaction between Shiga toxin B-subunits and linear polymers bearing clustered globotriose residues. *Infect. Immun.*, in press