

総説

細菌毒素による宿主傷害機構の解明

八尋錦之助*

京都薬科大学 微生物・感染制御学分野

人類は、これまで様々な感染症と出会い、そのたびにその原因の究明と治療法や対処方法を確立すべく努力してきた。感染症の原因となるのは日々の暮らしの中で常に身近にある、ヒトの肉眼ではとらえることができない微生物である。特に病原性の高い微生物（ここでは細菌に焦点を当てる）の多くは、宿主の恒常性を攪乱する蛋白質性或いはペプチド性の外毒素を産生している。これら外毒素は、各々が特異な生理活性を有しており、宿主の膜機能を破壊して、細胞内へ侵入し、様々な機能を停止或いは過剰な亢進を引き起こすことで傷害を与えている。著者等は、細菌毒素の宿主傷害機構を様々な実験的手法を用い解析し、病態発症における役割の解明、新規の生命現象の発見、創薬の基盤創出を目指し研究を行っている。本総説でその一端を紹介する。

キーワード：細菌毒素，細胞死，蛋白質精製，網羅的解析，個体評価

受付日：2022 年 6 月 15 日，受理日：2022 年 10 月 7 日

1. はじめに

著者は、大学4年生の研究室配属で、ペプチド合成を主なテーマとする故・青柳東彦教授（長崎大学名誉教授）、新留琢郎助教（現熊本大工学部教授）の研究室に配属されることになった。この研究室はとても学生に人気があったため、所属学生全員が研究室に入りきれないという事態が発生。そこで急遽、青柳先生が共同研究されていた長崎大学熱帯医学研究所（熱研）細菌学教室を主催されたばかりの平山壽哉教授（長崎大学名誉教授、現 AMED オフィサー）の研究室に私を含めた3人が学内共同研究ということで熱研に配置されることになった。工

学部でのペプチド合成化学から細菌学へと全くの異分野への扉を叩くことになったきっかけである。

熱研は20ある全国共同利用の附置研究所の一つとして、熱帯病の研究を主にしており、ベトナムやケニアの海外拠点も有している。また、JICA 国際協力事業を通じて世界各地から多くの研究者が各分野に來られ研究されているため国際色豊かな研究所である。

本項では、著者等がこれまで扱ってきた細菌の性状と外毒素の宿主傷害機構の解析研究の概略を紹介する。

2. ピロリ菌感染における胃炎・胃潰瘍に 関与する細胞空胞化毒素（VacA）

ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）は、ノーベル賞受賞者であるオーストラリアの Marshall

*連絡先：

〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町5
京都薬科大学 微生物・感染制御学分野

博士と Warren 博士が胃炎・胃潰瘍の患者の胃から分離・培養したグラム陰性の螺旋菌である¹⁾。発見当初は、その形態からカンピロバクター・ピロリと呼ばれていたが、性状等の違いから、後に名称が変更された。ピロリ菌は、細菌叢の確立していない幼年期に経口的に侵入し、胃に慢性感染すると考えられている²⁾。感染後、数十年という長い年月をかけて徐々に傷害し、胃炎→胃潰瘍→胃癌を含む様々な病態が進行する³⁾。

日本は、高齢者でのピロリ菌感染率が非常に高い国の一つである。現在、本菌の早期除菌治療が胃癌発症の予防になることから、2つの抗菌薬（クラリスロマイシン、アモキシシリン）と胃酸分泌を抑制するプロトンポンプ阻害剤の3剤併用による除菌治療が推奨されており、1) 慢性胃炎、2) 胃潰瘍・十二指腸潰瘍、3) 胃 MALT リンパ腫、4) 特発性血小板減少性紫斑病、5) 早期胃癌の5つが保険診療でピロリ菌検査及びピロリ菌除菌治療ができる疾患である。詳細は、日本ピロリ学会が発行している「*H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン 2016」を参照して頂きたい。

2-1. VacA の精製

空胞化致死毒素 (Vacuolating cytotoxin, VacA) は、ピロリ菌のみが保有する分泌型の外毒素である。細胞に取り込まれた VacA は宿主細胞内に空胞を形成し (図 1)、細胞死を誘導する⁴⁾。

著者が研究室で最初に与えられたテーマは、ピロリ菌の培養上清からの VacA を精製することであった。VacA は、N-末端側に毒性発現領域 (37 kDa) と C-末端側に宿主認識領域 (58 kDa) から構成される約 90 kDa の蛋白質であり、菌体から分泌された後、速やかに会合し 600 kDa を超える巨大分子となる⁴⁾。そのため大腸菌などによる組換え蛋白質として発現することが困難であった。

当時、米国の Cover 博士等が VacA の精製法を報告していたが⁵⁾、日本では、ピロリ菌の培養方法も手探りの状態であったため、まずピロリ菌の培養からのスタートであった。ピロリ菌は微好気性条件下、ウマ血液寒天培地でコロニーが形成するまでに4日間を要する、更に、この菌を無血清の液体培地に懸濁し、4～5日間をかけて同条件下振盪培養し、VacAを含んだ培養上清を得ることができる。非常に手間とお金のかかる菌である。既報に従い硫酸アンモニウム沈殿からのカラム精製を行ったが、全く追試することが出来なかったため新たな精製法を確立する必要があった。その後、1年間をかけて種々のカラムを用いて VacA の精製方法を本邦で初めて確立した⁶⁾。この精製に時間を費やしている間に、新留博士の合成した VacA ペプチド (Glu⁶⁹-Arg⁸³) を抗原としてウサギを免疫し、抗 VacA ペプチド抗体を作成した⁶⁾。

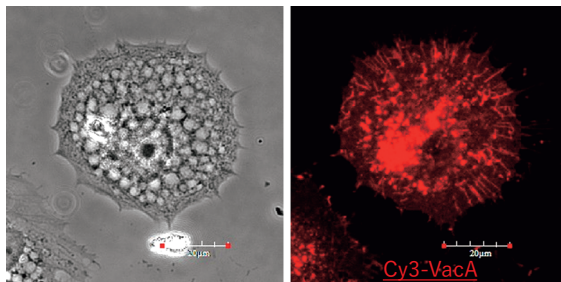


図 1 VacA による細胞空胞化 (左側、位相差画像) と蛍光標識された VacA の細胞内局在 (右側)

2-2. VacA 受容体の探索と同定

次に著者等は、VacA がどのように細胞に取り込まれて、細胞傷害性を示すかに焦点を当てるため、その入り口となる宿主受容体の同定を試みた。VacA に結合する細胞膜蛋白質を見出すため、十二指腸癌由来細胞の可溶化液を用いて抗 VacA ペプチド抗体を用いた免疫沈降法を行い、VacA 特異的に結合してくる蛋白質を SDS-PAGE 後、銀染色で同定を試みたがバックグラウンドが高く見出せなかった。そこで、膜蛋白質に特異的な標識を導入すれば効率良く検出できると考え、細胞を可溶化する前に細胞表面の蛋白質をビオチンで標識した。可溶化後、抗 VacA 抗体を用いた免疫沈降物を Avidin-HRP によるウエスタンブロット法で検出したところ、VacA 特異的に結合した 140 kDa (p140) と 250 kDa (p250)⁷⁾ の膜蛋白質を検出することができた⁶⁾。

この膜蛋白質を同定するため、VacA 免疫沈降物を用いて TOF-Mass 解析を行ったが、解析に耐えうる量ではなかった。次に、膜蛋白質の多くが糖鎖修飾されていることを利用して精製・濃縮する方法を試みることにした。まず、140 kDa と 250 kDa に修飾されている糖鎖をレクチンブロットで解析した所、両膜蛋白質ともピーナッツレクチン (PNA) が反応する糖鎖を持つことを見出した。そこで、PNA 結合カラムを用いて細胞可溶化液から標的膜蛋白質 (p140, p250) を粗精製し、TOF-Mass 解析により解析した。結果、p250 はそれまで、脳にしか発現していないとされていた受容体型チロシンフォスファターゼ (RPTP) β であり、p140 は RPTP α であることがわかった^{7,8)}。

VacA の精製は、倉園久生 博士 (現徳島大教授) の作成された抗 VacA 抗体カラムを使用することで飛躍的に簡便に高収量の VacA を得ることが可能になり、多くの共同研究者に提供で

きるようになった。

2-3. 宿主の細胞内シグナルに対する VacA の影響

VacA の RPTP β を介したシグナル伝達機構が病態発症に関与するか明らかにするため、基礎生物学研究所の野田昌晴教授 (現東工大特任教授) との共同研究をさせていただいた。野田教授の研究室で作成された RPTP β KO マウスに VacA を経口投与したところ、野生型マウスで認められた胃炎・胃潰瘍形成が有意に減少したことから、胃に発現している RPTP β は VacA による胃炎・胃潰瘍形成に関与することが明らかとなった⁹⁾ (図 2)。

木村美幸 博士 (現国立感染研) は、VacA がミトコンドリア傷害を引き起こすこと¹⁰⁾、また、宿主細胞の GSH 代謝を低下させ、酸化ストレスに対する抵抗性を減弱させることを報告している¹¹⁾。山崎栄樹 博士 (現・帯広畜産大学・准教授) 等は、VacA による細胞死がミトコンドリアを介したアポトーシスであることを報告した¹²⁾。中山真彰 博士 (現岡山大学・歯・助教) と久恒順三 博士 (現国立感染研) 等は、VacA はラフトを介して細胞内に侵入し¹³⁾、p38/ATF2 を介したシグナル伝達系の活性化¹⁴⁾ がシクロオキシゲナーゼ-2 の発現を誘導し、プロスタグランジン E₂ の産生を促進することを報告した¹⁵⁾ (図 2)。

また、著者等はアサヒビールとの産学連携研究により、田頭素行 博士 (現アサヒビール研究開発本部部長) が研究していたホップポリフェノールが VacA に吸着し、胃炎発症を抑えることを見出した¹⁶⁾。この結果から、様々なポリフェノールが細菌毒素の中和活性を持つという新たな機能を見出すことができた^{17,18)}。

更に解析を進めると、VacA は RPTP β よりも高分子の低密度リポ蛋白質受容体関連蛋白質 1 (LRP1) を認識し、オートファジー形成を誘導

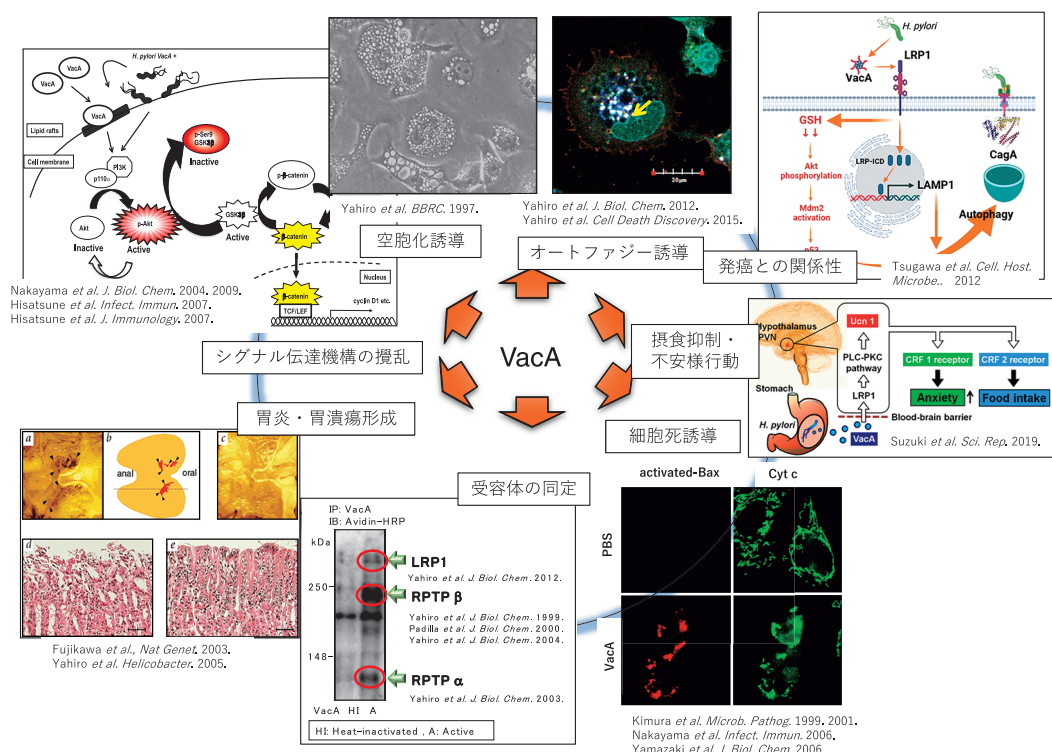


図2 多様な活性を有する VacA

VacA は、宿主細胞に空胞形成を誘導するだけでなく、オートファジー形成誘導、シグナル伝達機構の攪乱など多様な作用を持つ。

すること¹⁹⁾、このオートファジー区画にギャップジャンクションで機能する Connexin 43 (Cx43) が過剰に蓄積し細胞死に関与することを報告した²⁰⁾ (図2)。

鈴木甫博士 (現鹿児島大・歯・助教) 等は、ピロリ菌除菌後体重増加率が亢進するという事象に着目したマウスを用いた研究で、ピロリ菌が産生した VacA が摂食抑制系物質コルチコトロピン放出因子 (CRF) ファミリーペプチドの一つである Ucn1 の視床下部での発現上昇を促し、CRF2 受容体軸の活性化による摂食抑制、CRF1 受容体軸を介したシグナルによる不安様行動を引き起こすことを報告している²¹⁾。つまり、除菌されることでこれらが改善されて、食欲増進による体重増加に繋がると考えられた (図2)。

津川仁博士 (現東海大・医・講師) 等は、ピロリ菌の発癌因子であるエフェクター蛋白質 CagA と VacA との発癌における関連性に関する知見を報告した (図2)。CagA は、タイプIV分泌装置で菌体から直接宿主に打ち込まれるが、宿主細胞内で VacA により誘導されるオートファジーで分解されている。しかし、CD44v9 を発現するがん幹細胞では VacA によるオートファジー形成が不全であるため、CagA の蓄積が細胞内で増加し胃癌の発症リスクが増加すると考えられた²²⁾。

当初、VacA は空胞化形成という劇的な形態変化を引き起こす毒素として注目を集めたが、研究が進むにつれて、オートファジーなどの新たな生命現象に関連する様々なシグナル伝達機構に関与しており、これらが胃炎・胃潰瘍・胃

癌などの病態発症に寄与していることが明らかになった。

3. 腸管出血性大腸菌の産生する 小胞体ストレス誘導毒素 Subtilase cytotoxin (SubAB)

病原性大腸菌の一つである腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、グラム陰性の鞭毛を持った桿菌である。主に食中毒の原因菌として知られている²³⁾。

本菌は自然宿主であるウシの腸管に棲息することから、ウシの糞便などで汚染された食物や水、その水により汚染された食物などをヒトが摂取することで病態が現れると考えられている²⁴⁾。比較的少ない菌数で感染が成立し発症のリスクが高まることが知られている。国立感染症研究所の年次報告では、日本では EHEC による感染事例報告が毎年 3000 件近くに上る。その中でも EHEC O157:H7 株による感染事例が最も多く報告されている。主な病態は、腹痛・下痢・血便等であり、重症化すると尿毒症症候群 (HUS) や脳症を引き起こし死に至ることもある。

主要な病原因子である志賀毒素 Stx (Stx1, Stx2) は、宿主受容体である Gb₃²⁵⁾ に結合した後、細胞内に取り込まれ 28S リボソーム RNA に作用し蛋白質合成阻害により細胞死を誘導する²⁶⁾。Stx を産生する EHEC の多くは Locus of Enterocyte Effacement (LEE) と呼ばれる 35-kb の遺伝子領域を染色体上に保有しており、この領域にコードされる蛋白質群は、宿主腸管上皮細胞への接着や Stx の産生に関与している²⁷⁾。

2014 年にオーストラリアの Paton 博士等が HUS を発症した患者から分離した EHEC O113:H21 株で新しい毒素 Subtilase cytotoxin (SubAB) を発見した²⁸⁾。この株は LEE を保有しておらず、LEE を持つ EHEC (O157:H7 株など)

と異なる性状をもつことが示唆された。盛永直子博士 (元千葉大准教授) が千葉大学病院の臨床分離株 O113:H21 から日本で初めてこの SubAB をクローニングし、His- タグ融合蛋白質として精製した²⁹⁾。著者は SubAB の受容体の探索や細胞傷害機構の解析を目的として共同研究の機会を頂いた。LEE 領域を持たない EHEC の約 25% が SubAB 毒素産生性であると報告されている³⁰⁾。一方、LEE を保有する EHEC は Stx1 and/or 2 を持つが、SubAB は確認されなかった。興味深いことに、SubAB を保有する EHEC は病原性の高い Stx2 を一緒に保有している割合が非常に高いことが知られている。以上から、SubAB 保有 LEE 陰性 EHEC は、Stx2 と相乗的に宿主を傷害し、病態の重症化に関与すると考えられる³¹⁾。

3-1. SubAB による宿主傷害機構

SubAB は、低濃度で細胞死を引き起こし²⁹⁾、一過性の蛋白質合成阻害、サイクリン D1 の減少による細胞周期の停止を引き起こす³²⁾。本毒素の発見者である Paton 博士等が、SubAB の細胞内基質が小胞体内のシャペロン蛋白質である Grp78/BiPであることを Nature に報告し、小胞体ストレスを誘導する初の細菌毒素であることを示した³³⁾。小胞体ストレスは、糖尿病、炎症、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経疾患、双極性障害などの様々な病態³⁴⁾だけでなく、低酸素による宿主応答³⁵⁾、癌の発達制御³⁶⁾に関与するとされ注目を集めている。著者等も、彼らの論文が出る直前に SubAB 処理した細胞可溶化液の二次元電気泳動で特異的に分子質量が変化する物を見出していたが、完全に先を越される結果であった。追試の結果、この変化した蛋白質が BiP であることを確認した。

また、細菌毒素では初めてストレスグラニュール (SG) 形成を誘導することを見出した (図 3)³⁷⁾。環境から受ける様々な刺激から身

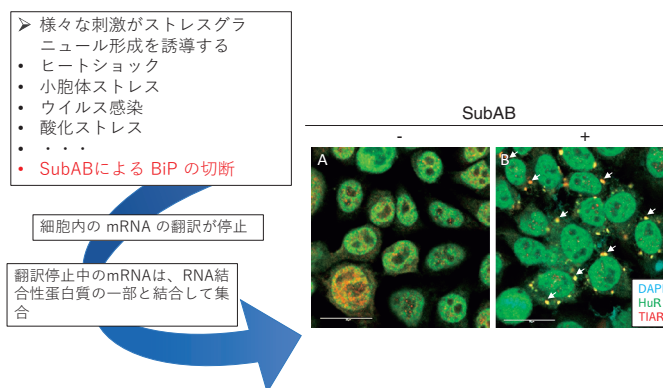


図3 SubABにより誘導されたストレスグアニュール (SG) 形成³⁷⁾

細胞は、様々な刺激（ヒートショック、ウイルス感染など）により、細胞内の mRNA の翻訳を停止する。この時、細胞中の mRNA は RNA 結合蛋白質の一部と結合して膜構造を持たない会合体 SG を細胞質に形成する。HeLa 細胞にコントロール (A)、SubAB を添加 (B) 後、4% パラホルムアルデヒドで固定した後、SG のマーカー蛋白質である 2 種類の RNA 結合蛋白質 HuR (緑) と TIAR (赤) で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。核は DAPI (青) で染色した。SG は右側の写真の細胞質内の黄色の斑点。

を守るシステムとして蛋白質合成の停止と共に、細胞内に膜構造を持たない mRNA-RNA 結合蛋白質などを含む凝集体 SG の形成が、宿主細胞がストレスに適応する機構として重要であることが報告されている³⁸⁾。SG の構成成分はその刺激の種類やその時間によって異なることが知られており³⁹⁾、神経性疾患の病態で観察されていることから、新たな治療標的として注目されている⁴⁰⁾。SubAB により形成される SG は PKA や PKC の活性化等で阻害されることから、これらの活性阻害が SG 形成に関与していると推察される³⁷⁾。

SubAB の細胞傷害機構を更に解析したところ、BiP の切断を引き金にして、小胞体膜上の 3 つあるストレスセンサー蛋白質のうちの PERK の活性化、eIF2 α のリン酸化による蛋白質合成阻害、Bcl ファミリー蛋白質である Bax/Bak の構造変化による会合体形成、この会合体を介したミトコンドリアからのチトクローム c の細胞質への放出、カスパーゼの活性化によるアポトーシス (図 4)^{41, 42)}、さらに SubAB の細胞への取り込みにおけるアクチンと脂質ラフトの必要性を見出した⁴³⁾。

更に、SubAB による細胞傷害機構の新たな因子を見出すため、RNAseq、マイクロアレイなどの網羅的解析を行い、特異的に増加或いは減少する遺伝子を特定し、細胞致死機構における役割を解明することにした。結果、452 個の遺伝子の増加、271 個の遺伝子の減少が見られた。増加していた mRNA の多くは既知の小胞体ストレス関連シグナル伝達因子であった。増加した物の中に自然免疫蛋白質であるリボカリン 2 (LCN2) や機能未知の Kelch Domain Containing 7B (KLHDC7B) 等が認められた。

宿主細胞が産生する鉄獲得性の分泌蛋白質 LCN2 は、細菌の抗増殖活性を有することが報告されている⁴⁴⁾。SubAB により上昇した LCN2 mRNA の発現は、小胞体ストレスセンサー蛋白質 PERK、C/EBP 相同蛋白質 CHOP のノックダウンにより抑制された。免疫蛍光染色観察から SubAB により増加した LCN2 は分泌されず、細胞内に蓄積していた。これは、LCN2 が小胞体ストレス下では翻訳後の糖鎖修飾不全を来とし、細胞外への分泌ができなくなったためと考えられた。本結果は、SubAB が宿主の防御に働く抗菌活性物質不全を引き起こし、EHEC の生

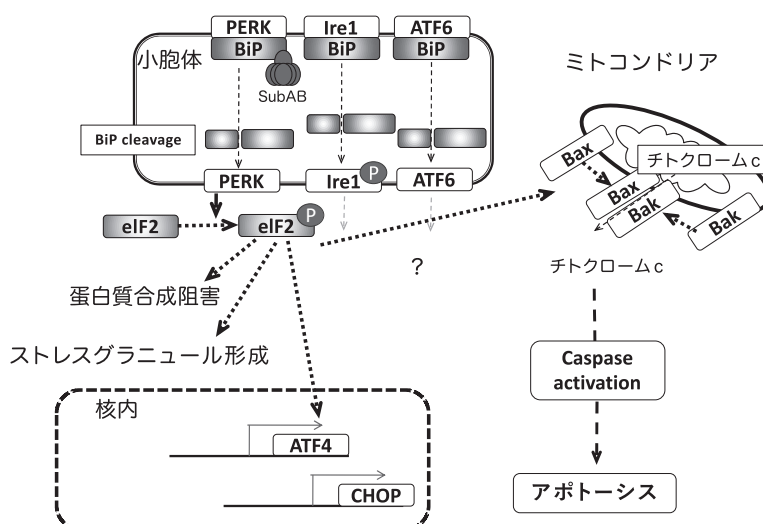


図4 SubABの小胞体ストレスによる細胞致死機構^{32,42,58)}

小胞体膜上には3種類のストレスセンサー蛋白質 (PERK, Ire1, ATF6) があり, SubABによりシャペロン蛋白質 BiP が切断されるとこれらのセンサー蛋白質が活性化する. PERK の下流にある eIF2α はリン酸化され一過性の蛋白質合成阻害を引き越す. 同時に小胞体ストレス下で発現する転写因子である ATF4 や CHOP などが誘導される. ミトコンドリア膜上では Bcl ファミリー蛋白質である Bax, Bak の構造変化に伴い会合体形成が起こり, ミトコンドリアから細胞質へのチトクローム c の放出が促され, 下流のカスパーゼを活性化することで細胞死 (アポトーシス) を誘導する.

存亢進に寄与することを示唆している⁴⁵⁾.

SubAB により最も増加した KLHDC7B の発現も小胞体ストレスセンサー蛋白質 PERK の発現抑制により阻害され, 下流シグナルの PERK/ATF4/CEBPB のシグナル伝達機構が KLHDC7B の発現に関与していることが示唆された. KLHDC7B の siRNA によるノックダウンは, SubAB による細胞死を抑制した. 更に, KLHDC7B が制御する遺伝子を RNAseq 解析により検索した所, Harakiri (HRK) を見出した. HRK は, アポトーシス阻害蛋白質 Bcl-2 と Bcl-xL に結合することでアポトーシスを亢進することが知られている. HRK ノックダウン細胞では, チトクローム c のミトコンドリアから細胞質への放出に働く, ミトコンドリア膜上の Bak/Bax の構造変化を伴う会合体形成が阻害されることで, アポトーシスシグナルが抑制されていた⁴⁶⁾. 以上の結果から, SubAB による小胞体ストレスにより増加した機能未知である

KLHDC7B は, 細胞死に関与する HRK を発現制御し, 細胞死に関与していることが示された (図5).

更に, 津々木博康 博士 (現熊本大・医・助教) 等は, SubAB のマウスマクロファージの生体防御機構への影響に加えて, マウスにのみ感染する大腸菌に SubAB を産生させ, この SubAB 産生菌を感染させたマウスモデルを樹立し解析した. SubAB は, LPS 刺激で活性化する NF-κB を介した一酸化窒素 (NO) の産生を阻害し, マクロファージに貪食された EHEC の生存に寄与したり⁴⁷⁾, カスパーゼ 1 の阻害によるインフラマソーム不活性化と自然免疫で重要な IL-1β と IL-18 の産生を抑制することを発見した⁴⁸⁾. これは, SubAB が宿主免疫を攪乱することで病原体の排除を阻害する働きを担っていると推察している.

著者等は, SubAB の細胞傷害阻止効果を多くの阻害剤を添加し調べているとき, SubAB の

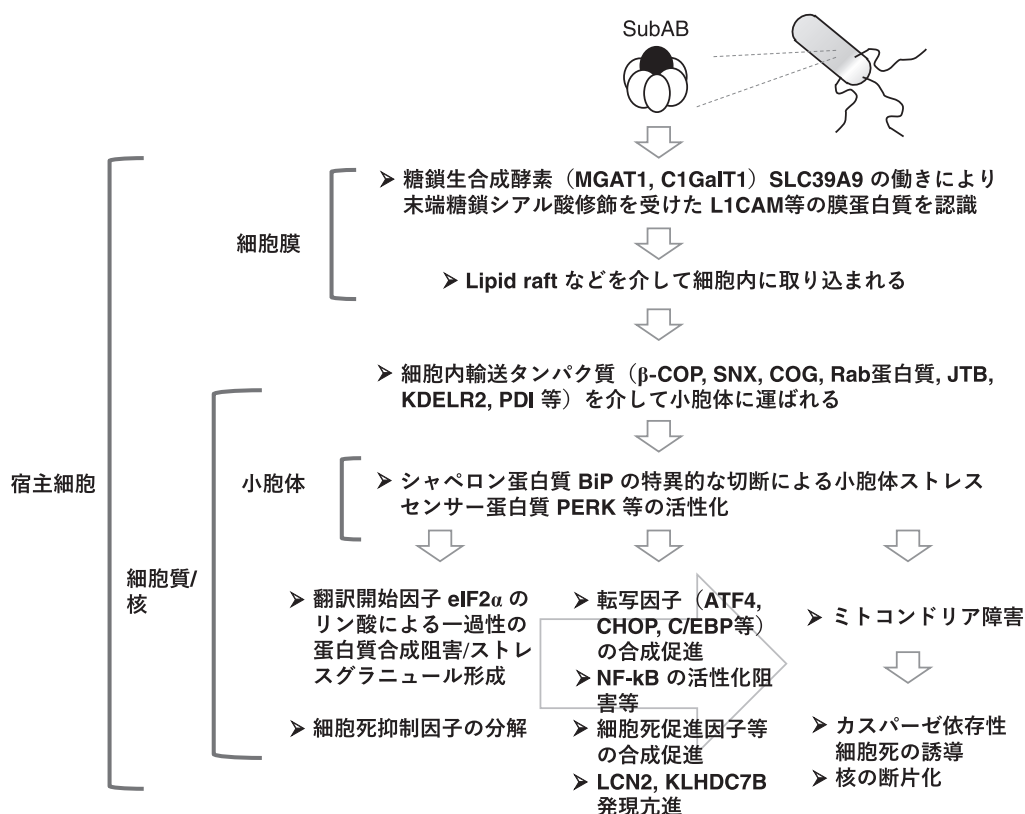


図5 SubABの細胞内シグナル伝達機構 (全体像)⁵⁹⁾

細胞致死活性を PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) が抑えることを見出した⁴⁹⁾。PMA は発癌物質による癌の形成を促進する発癌プロモーターであり薬となりえない。そこで、既に臨床で使用されている PMA と同じ活性を持った薬剤の検索 (ドラッグリポジショニング) を行い、diacylglycerol アナログである bryostatin 1 と Ingenol-3-angelate に SubAB の細胞致死活性を阻害する活性を発見した。更に、ステロイド (デキサメタゾン等) の添加は、ERK の活性化を介して抗アポトーシス活性を持つ Bcl-xL を発現亢進させ、細胞死を阻害することが分かった⁵⁰⁾。残念なことに個体レベルでは十分な効果を見出せなかったが、更なる薬剤スクリーニングを行うことでより効果の高いものを見出せるのではないかと考えている。

個体レベルでの EHEC 感染症における SubAB の役割を理解するため、著者等は精製した SubAB をマウスの腹腔内に注射した。全てのマウスにおいて、上部消化管内に大量の出血が確認され、72 時間以内に致死に至ったことから、SubAB は腸管出血を引き起こす毒素であることが明らかとなった⁵¹⁾。

細胞がストレスを受けた際、このストレスを回避すべく蛋白質合成の減少等が起きる一方で、ストレス下でのみ選択的に合成されてくる恒常性の維持に働く蛋白質が存在し、これら選択的に発現が誘導される蛋白質は、5' 非翻訳領域 (5'UTR) の上流に小さなオープンリーディングフレーム (uORFs) を持つことが知られている。Starck 博士等は、この uORF 中にトレイサーペプチドをコードする配列を挿入した新た

な検出方法を創出し、恒常性の維持に働く蛋白質の翻訳が 5' UTR 配列中の non-AUG で開始される uORF 依存的であることを SubAB を用いた実験で示した⁵²⁾。

3-2. SubAB 受容体の検索と同定

SubAB が Stx と同じ AB₅ 型の毒素であったため、Stx の受容体である Gb₃²⁵⁾ と似た糖脂質 G_{M2} が SubAB の受容体であるとの報告²⁸⁾があったが、その後、糖脂質ノックアウトマウスを使用した研究で SubAB の投与によりこれらマウスが致死に至ったため否定された⁵³⁾。著者等は、まず SubAB の受容体検索を VacA 受容体を同定したときと同じ手法を用い、細胞表層蛋白質をビオチン標識した後、その細胞可溶化液を使用し、SubAB 特異的に結合する膜蛋白質（インテグリン $\alpha 2\beta 1$, L1CAM, NG2）を免疫沈降法により同定した^{54, 55)}。これら SubAB 結合膜蛋白質と SubAB との結合は、N-リンクの糖鎖を切断する N-グリコシダーゼや、末端糖鎖シアル酸を切断するノイラミニダーゼで処理した細胞可溶化液を用いた場合に消失することから、SubAB はこれら膜蛋白質の糖鎖を認識していると考えられた。

Paton 博士のグループが、SubAB が結合する末端糖鎖シアル酸はヒトでは合成されない Neu5Gc であると報告した⁵⁶⁾。彼らは、飲食した食品中の Neu5Gc が吸収された後、転移修飾され細胞表面に出てきた Neu5Gc 修飾膜蛋白質が、SubAB により受容体として認識されると考えている⁵⁶⁾。著者等は、共同研究者である山地俊之博士（現国立感染研・細胞化学部・室長）が作成した genome-wide CRISPR/Cas9 knockout 細胞を用いて、遺伝子破壊により SubAB 致死耐性細胞を樹立し、耐性を示す遺伝子の検索を行う中で SubAB 受容体を検索した⁵⁷⁾。結果、種々の糖鎖生合成酵素（MGAT1, C1GalT1）、膜輸送蛋白質が SubAB の細胞死に関与していること

が明らかとなった。末端糖鎖シアル酸に加え、N 型だけでなく、O 型糖鎖に修飾された膜蛋白質が SubAB の受容体として機能した。また、これまで亜鉛トランスポーターと考えられていた SLC39A9 の発現阻害により、SubAB と結合する宿主膜蛋白質 L1CAM との結合能の消失、L1CAM の分子質量の減少が認められたことから、新たに SLC39A9 が糖鎖修飾に働いていることが判明した。

また、本研究では Neu5Gc は検出されずヒト細胞が合成することができると末端糖鎖シアル酸 Neu5Ac が修飾された L1CAM を SubAB が認識していることが分かった。現在、このスクリーニングで得た情報を元に新たな細胞傷害機構に関わる因子の解析を進めている。また、細胞内外の miRNA の変化とその制御機構にも着目し研究を行っている。

4. おわりに

本項では、著者等が行ってきた細菌毒素の宿主応答機構について紹介した。最初に手がけたピロリ菌の培養上清からの VacA の精製、受容体の同定という一連の研究を大学院生時代に土日無く研究室で手を動かし実験し、先輩や国内外の研究室の先生等とも議論させていただきながら、運良く論文として発表できたことがきっかけとなり、その後の多くの共同研究の発展に繋がった。

蛋白質の精製は、論文の方法論の所では数行で終わることが多いが、実際に、手を動かしている現場で行われているカラムを通して純度を上げる作業は多大な時間と労力、試行錯誤の連続である。

特に細菌の産生する物や宿主細胞からの蛋白質精製で注意が必要なことは、精製初めの量である。小スケールで培養し、精製し途中で活性

や標的物が無くなることは多々あり、また、たまたま物が取れたとしても大量培養の系にスケールアップするとエアレーション等の条件の変化で活性のある標的物がほとんど無いということもある。そのためにも培養条件を検討し、最初に大量の標的蛋白質を含むものを準備することが重要である。もう一つは、活性があり実験に使用できる充分量の精製物が取れてからが研究のスタートであると言うことを認識しておく必要がある。

細菌毒素の興味深い点は、各々の毒素が個性的な性状を持つことである。その活性は、細胞傷害だけでなく、免疫系や代謝系の攪乱などを引き起こし病態発症や悪化、或いは宿主への持続感染などに寄与している。その制御機構を研究する過程で得られる情報、即ち細菌感染における病態発症・傷害必須因子の機能や新たな生命現象の知見が、治療・創薬基盤の構築に繋がると考えている。

本項では紹介を省いたが、米国の NIH 留学から帰国後、コレラ菌のゲノムから Cholix という新規 ADP- リボシル化毒素のクローニング、精製を行った。この毒素は腸管に感染するコレラ菌が産生する毒素ではあるが、標的臓器は肝臓という興味深い性質を持つ。現在こちらも、研究室の学生が一生懸命解析を進めている。別の機会に紹介させて頂ければと思っている。今後も継続して多くの先生がたと共同で研究を推進したいと思っています。興味を持たれた方は是非ご連絡をお待ちしております。

【謝辞】

本研究の大部分は、著者の所属した長崎大学大学院工学研究科生体機能工学研究室、長崎大学熱帯医学研究所細菌学教室、千葉大学医学部病原細菌制御学で行われたものである。本研究を行うにあたり、公私にわたりご支援を賜りました平山壽哉名誉教授、野田公俊名誉教授、青柳東彦名誉教授、盛永直子博士、

Joel Moss 博士、共同研究者として現在も研究をさせていただいている国立感染症研究所細菌第一部の伊豫田淳博士を初め多くの共同研究者の先生方に感謝申し上げます。また本研究における受容体の TOF-Mass 解析は佐藤守博士（現株式会社エスアールエル）、CrisperCAS9 KO スクリーニングは国立感染症研究所細胞化学部の山地俊之博士のご協力により行われたものであり、深く感謝申し上げます。本項で紹介した研究成果は、科学研究費、武田財団医学系研究奨励・奨励継続研究費、長崎大学熱帯医学研究所共同研究費、千葉大学「若手研究者の自立的な研究環境整備促進：優れた若手研究型教員の人材育成システム（テニユアトラック）」、AMED の「新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発推進事業」などのサポートによるものである。

【利益相反】

本総説の内容に関連し、著者の開示すべき利益相反はありません。

【引用文献】

- 1) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1984**, 1(8390), 1311-1315.
- 2) Mitchell HM, Li YY, Hu PJ, Liu Q, Chen M, Du GG, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. *J Infect Dis* **1992**, 166(1), 149-153.
- 3) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* **2001**, 345(11), 784-789.
- 4) Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PL, et al. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol* **1996**, 133(4), 801-807.
- 5) Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **1992**, 267(15), 10570-10575.
- 6) Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Padilla PI, et al. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, 238(2), 629-632.
- 7) Yahiro K, Niidome T, Kimura M, Hatakeyama T,

- Aoyagi H, Kurazono H, *et al.* Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol Chem* **1999**, 274(51), 36693–36699.
- 8) Yahiro K, Wada A, Nakayama M, Kimura T, Ogushi K, Niidome T, *et al.* Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J Biol Chem* **2003**, 278(21), 19183–19189.
 - 9) Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, *et al.* Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nature Genetics* **2003**, 33(3), 375–381.
 - 10) Kimura M, Goto S, Wada A, Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, *et al.* Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog* **1999**, 26(1), 45–52.
 - 11) Kimura M, Goto S, Ihara Y, Wada A, Yahiro K, Niidome T, *et al.* Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog* **2001**, 31(1), 29–36.
 - 12) Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I, Funao J, Nakayama M, *et al.* *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem* **2006**, 281(16), 11250–11259.
 - 13) Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Nishi Y, Wada A, Kurazono H, *et al.* Clustering of *Helicobacter pylori* VacA in lipid rafts, mediated by its receptor, receptor-like protein tyrosine phosphatase beta, is required for intoxication in AZ-521 cells. *Infect Immun* **2006**, 74(12), 6571–6580.
 - 14) Nakayama M, Kimura M, Wada A, Yahiro K, Ogushi K, Niidome T, *et al.* *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J Biol Chem* **2004**, 279(8), 7024–7028.
 - 15) Hisatsune J, Yamasaki E, Nakayama M, Shirasaka D, Kurazono H, Katagata Y, *et al.* *Helicobacter pylori* VacA enhances prostaglandin E-2 production through induction of cyclooxygenase 2 expression via a p38 mitogen-activated protein Kinase/Activating transcription factor 2 cascade in AZ-521 cells. *Infect Immun* **2007**, 75(9), 4472–4481.
 - 16) Yahiro K, Shirasaka D, Tagashira M, Wada A, Morinaga N, Kuroda F, *et al.* Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Helicobacter* **2005**, 10(3), 231–239.
 - 17) Choi O, Yahiro K, Morinaga N, Miyazaki M, Noda M. Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of *Staphylococcal* alpha-toxin. *Microb Pathog* **2007**, 42(5–6), 215–224.
 - 18) Morinaga N, Yahiro K, Noda M. Resveratrol, a natural polyphenolic compound, inhibits cholera toxin-induced cyclic AMP accumulation in Vero cells. *Toxicol* **2010**, 56(1), 29–35.
 - 19) Yahiro K, Satoh M, Nakano M, Hisatsune J, Isomoto H, Sap J, *et al.* Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 (LRP1) Mediates Autophagy and Apoptosis Caused by *Helicobacter pylori* VacA. *J Biol Chem* **2012**, 287(37), 31104–31115.
 - 20) Yahiro K, Akazawa Y, Nakano M, Suzuki H, Hisatsune J, Isomoto H, *et al.* *Helicobacter pylori* VacA induces apoptosis by accumulation of connexin 43 in autophagic vesicles via a Rac1/ERK-dependent pathway. *Cell Death Discovery* **2015**, 1: 15035.
 - 21) Suzuki H, Ataka K, Asakawa A, Cheng KC, Ushikai M, Iwai H, *et al.* *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin A Causes Anorexia and Anxiety via Hypothalamic Urocortin 1 in Mice. *Sci Rep* **2019**, 9(1), 6011.
 - 22) Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, *et al.* Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of *Helicobacter pylori* CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host Microbe* **2012**, 12(6), 764–777.
 - 23) Scheut F. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* **2014**, 2(3).
 - 24) Takesue K, Nakanishi K, Nakazawa S, Lin Z, Yamasaki S, Takeda Y. Isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* from cattle and characterization of the isolated strains. *Kansenshogaku Zasshi* **1997**, 71(2), 162–168.
 - 25) Waddell T, Head S, Petric M, Cohen A, Lingwood C. Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2. *Biochem Biophys Res Commun* **1988**, 152(2), 674–679.
 - 26) 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 of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the

- toxins. *Eur J Biochem* **1988**, 171(1-2), 45-50.
- 27) Karmali MA. Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis* **2004**, 189(3), 355-359.
- 28) Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H, Paton JC. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med* **2004**, 200(1), 35-46.
- 29) Morinaga N, Yahiro K, Matsuura G, Watanabe M, Nomura F, Moss J, *et al.* Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **2007**, 75(1), 488-496.
- 30) Miko A, Rivas M, Bentancor A, Delannoy S, Fach P, Beutin L. Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Front Cell Infect Microbiol* **2014**, 4: 78.
- 31) Wang H, Paton JC, Paton AW. Pathologic changes in mice induced by subtilase cytotoxin, a potent new *Escherichia coli* AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum. *J Infect Dis* **2007**, 196(7), 1093-1101.
- 32) Morinaga N, Yahiro K, Matsuura G, Moss J, Noda M. Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1. *Cell Microbiol* **2008**, 10(4), 921-929.
- 33) Paton AW, Beddoe T, Thorpe CM, Whisstock JC, Wilce MC, Rossjohn J, *et al.* AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* **2006**, 443(7111), 548-552.
- 34) Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* **2007**, 274(3), 630-658.
- 35) Akman M, Belisario DC, Salaroglio IC, Kopecka J, Donadelli M, De Smaele E, *et al.* Hypoxia, endoplasmic reticulum stress and chemoresistance: dangerous liaisons. *J Exp Clin Cancer Res* **2021**, 40(1), 28.
- 36) Lin Y, Jiang M, Chen W, Zhao T, Wei Y. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother* **2019**, 118: 109249.
- 37) Tsutsuki H, Yahiro K, Ogura K, Ichimura K, Iyoda S, Ohnishi M, *et al.* Subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces stress granule formation. *Cell Microbiol* **2016**, 18(7), 1024-1040.
- 38) Marcelo A, Koppenol R, de Almeida LP, Matos CA, Nobrega C. Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? *Cell Death Dis* **2021**, 12(6), 592.
- 39) Vanderweyde T, Youmans K, Liu-Yesucevitz L, Wolozin B. Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review. *Gerontology* **2013**, 59(6), 524-533.
- 40) Wolozin B, Ivanov P. Stress granules and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **2019**, 20(11), 649-666.
- 41) Yahiro K, Morinaga N, Moss J, Noda M. 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* **2010**, 49(4), 153-163.
- 42) Matsuura G, Morinaga N, Yahiro K, Komine R, Moss J, Yoshida H, *et al.* Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces apoptosis in Vero cells via mitochondrial membrane damage. *Infect Immun* **2009**, 77(7), 2919-2924.
- 43) Nagasawa S, Ogura K, Tsutsuki H, Saitoh H, Moss J, Iwase H, *et al.* Uptake of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB by HeLa cells requires an actin-and lipid raft-dependent pathway. *Cell Microbiol* **2014**, 16(10), 1582-1601.
- 44) Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **2004**, 432(7019), 917-921.
- 45) Yahiro K, Ogura K, Goto Y, Iyoda S, Kobayashi T, Takeuchi H, *et al.* Subtilase cytotoxin induces a novel form of Lipocalin 2, which promotes Shiga-toxigenic *Escherichia coli* survival. *Sci Rep* **2020**, 10(1), 18943.
- 46) Yahiro K, Ogura K, Tsutsuki H, Iyoda S, Ohnishi M, Moss J. A novel endoplasmic stress mediator, Kelch domain containing 7B (KLHDC7B), increased Harakiri (HRK) in the SubAB-induced apoptosis signaling pathway. *Cell Death Discov* **2021**, 7(1), 360.
- 47) Tsutsuki H, Yahiro K, Suzuki K, Suto A, Ogura K, Nagasawa S, *et al.* Subtilase Cytotoxin Enhances *Escherichia coli* Survival in Macrophages by Suppression of Nitric Oxide Production through the Inhibition of NF-kappa B Activation. *Infect Immun* **2012**, 80(11), 3939-3951.
- 48) Tsutsuki H, Zhang T, Yahiro K, Ono K, Fujiwara Y, Iyoda S, *et al.* Subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic

- Escherichia coli* impairs the inflammasome and exacerbates enteropathogenic bacterial infection. *iScience* **2022**, 25(4), 104050.
- 49) Tsutsuki H, Yahiro K, Ogura K, Ichimura K, Iyoda S, Ohnishi M, *et al.* Subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces stress granule formation. *Cell Microbiol* **2016**.
 - 50) Yahiro K, Nagasawa S, Ichimura K, Takeuchi H, Ogura K, Tsutsuki H, *et al.* Mechanism of inhibition of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB cytotoxicity by steroids and diacylglycerol analogues. *Cell Death Discov* **2018**, 4: 22.
 - 51) Furukawa T, Yahiro K, Tsuji AB, Terasaki Y, Morinaga N, Miyazaki M, *et al.* Fatal hemorrhage induced by subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **2011**, 50(3–4), 159–167.
 - 52) Starck SR, Tsai JC, Chen K, Shodiya M, Wang L, Yahiro K, *et al.* Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science* **2016**, 351(6272), aad3867.
 - 53) Kondo Y, Tokuda N, Fan X, Yamashita T, Honke K, Takematsu H, *et al.* Glycosphingolipids are not pivotal receptors for subtilase cytotoxin in vivo: sensitivity analysis with glycosylation-defective mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, 378(2), 179–181.
 - 54) Yahiro K, Morinaga N, Satoh M, Matsuura G, Tomonaga T, Nomura F, *et al.* Identification and characterization of receptors for vacuolating activity of subtilase cytotoxin. *Mol Microbiol* **2006**, 62(2), 480–490.
 - 55) Yahiro K, Satoh M, Morinaga N, Tsutsuki H, Ogura K, Nagasawa S, *et al.* Identification of subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun* **2011**, 79(2), 617–627.
 - 56) Byres E, Paton AW, Paton JC, Lofling JC, Smith DE, Wilce MC, *et al.* Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature* **2008**, 456(7222), 648–652.
 - 57) Yamaji T, Hanamatsu H, Sekizuka T, Kuroda M, Iwasaki N, Ohnishi M, *et al.* A CRISPR screen using subtilase cytotoxin identifies SLC39A9 as a glycan-regulating factor. *iScience* **2019**, 15: 407–420.
 - 58) Yahiro K, Tsutsuki H, Ogura K, Nagasawa S, Moss J, Noda M. Regulation of subtilase cytotoxin-induced cell death by an RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase-dependent proteasome pathway in HeLa cells. *Infect Immun* **2012**, 80(5), 1803–1814.
 - 59) Tsutsuki H, Ogura K, Moss J, Yahiro K. Host response to the subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* **2020**, 64(10), 657–665.