

〔最終講義〕 ミクロの世界のトキシンハンター －細菌毒素の無毒化プロジェクト－

野田 公俊

(2017年3月1日受付)

要 旨

病原性細菌が産生する蛋白性のAB₅型トキシンは1個のAサブユニットと5個のBサブユニットから構成される外毒素である。両サブユニットはそれぞれ特徴的な役割を持ち、互いに巧妙に機能分担をして一つのトキシンを形成している。Aサブユニットは主に毒性に直接関与する特異的な酵素活性を有する。一方、Bサブユニットは標的細胞のレセプターに対する結合能を有し、AB₅型トキシンを標的細胞に吸着させる。ここでは毒性が全く異なるAB₅型トキシンとして、コレラ菌が産生するコレラトキシン (CT)、腸管出血性大腸菌が産生する志賀様トキシン (Stx)、及び志賀トキシン産生大腸菌が産生するサブチラーゼサイトトキシン (SubAB) の3種類に関して、その作用メカニズムに着目した毒性を抑制する阻害因子の探索などの研究を紹介する。これらの3種類のAB₅型トキシンに着目した理由は、それぞれのトキシンを産生する病原菌による感染症が世界的に流行し、社会問題となっているからである。つまり、コレラ菌は依然として発展途上国で大きな問題であり、腸管出血性大腸菌のO157:H7による集団食中毒は我国でも依然として多い。さらに21世紀になり、血清型がO157:H7以外の腸管出血性大腸菌による集団食中毒が世界的に急増しているためである。いずれも抗生物質を使用した後の残留トキシンによる病態悪化が指摘されており、トキシンを効率よく無毒化する事が急務である。

Key words: 病原性細菌, トキシン

I. はじめに

千葉医学会から本原稿の執筆依頼をいただいた時に、幾つかの点を考慮すべきだと思った。千葉医学会は専門分野を異にする多くの会員から構成されている。研究成果や実績はもちろんの事、それらを専門外の研究者にも分かりやすいように記載する事、そして、若い研究者がその分野の研究をしたいと思うような魅力的な内容にする必要があるだろうと思った。次世代を担う若い研究者の興味を刺激する事、まさにこの原稿を本誌に掲載する最も重要な目的は、そこにあるのだと思っ

た。それらに十分に答える自信はないが、これまで行って来た我々の中心的な論文に、その周辺の関連領域の論文も加えて、私なりのチャレンジをしたいと思い、この原稿の執筆に取り組むことにした。

1) 細菌学との出会い

小学校四年生の時に読んだ北里柴三郎博士の伝記が私の心をととても刺激し、「肉眼では見えない小さな生き物のことを研究して、ヒトの病気を治すとは何と素晴らしいことだろう。」と感動した。そして、世界的に偉大な活躍をした北里博士にあ

千葉大学大学院医学研究院病原細菌制御学

Masatoshi Noda. A toxin hunter in the microworld of bacteria: a project on novel inhibitors against bacterial AB₅ toxins.

Department of Molecular Infectiology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

Phone: 043-226-2046. Fax: 043-226-2049. E-mail: noda@faculty.chiba-u.jp

Received May 1, 2017.

こがれ、博士を通して細菌学に興味を持つようになった。学校の図書室で小学生用の微生物の本などを読みあさり、今は廃刊になった子ども向けの有名な科学雑誌に付録でついてきた顕微鏡を使い、実験のまねごとを級友たちとして小学生時代を過ごした。

2) トキシンとの出会い

大学生になった頃には、細菌と生体との複雑な相互関係で起こる「細菌感染症の発症メカニズム」に興味を持つようになったが、研究室の仲間たちは「細菌自体の研究だけでも苦労しているのに、細菌と生体との相互関係の研究など、複雑すぎて無理だと思う。」と冷ややかであった。そんな時、加藤巖教授（現日本細菌学会名誉会員）の細菌性トキシンの研究を初めて知った。ジフテリアトキシンの作用機構に関する論文であった。これだと思った。細菌と生体の複雑な相互関係を、両者の間に介在する細菌性トキシンという生理活性物質に着目して鮮やかに解析し解明して行く研究であった。何と素晴らしい研究だろうと心が躍った。まさに私が目指していた「病原細菌が病気を起こすメカニズムの解明」そのものの研究だと思った。早速、東京大学医科学研究所で精力的に研究活動を展開されていた加藤巖教授に、不躰にも研究に対する思いなどを書いた手紙を送った。超多忙である先生に見ず知らずの学生が手紙を書くなど、今考えると冷や汗が出てくる。しかし、予期しない事がすぐに起こって私は大変驚いた。手紙を出してほんの数日しか経っていないのに、私のもとに加藤教授からの直筆の手紙が届いたのである。とても迫力のある文字が便箋をはみ出すような勢いで踊っていた。しかし、その内容は大変温かいものであった。面識も無い学生が出した手紙に対して、先生の研究に対する真摯な思いが長文でつづられていた。嬉しかった。先生のチームで細菌性トキシンの研究に取組もうと決心した。

3) トキシンとは

加藤巖教授からご指導頂いた細菌毒素の「毒素（トキシン）」の語源は、ギリシア語の弓矢を意味する toxon である。ヤジリ（鏃）に塗る毒を toxikon pharmakon と呼ぶ事から、toxon も矢毒

を意味するようになり、さらに英語では toxin に変化し、生物が産生する毒性物質全体を示すようになった。生物が産生する有害代謝産物は数多く知られており、それらは全てトキシンに分類される。一方、「トキシン」とは明確に区別される「毒物」の語源はラテン語の飲み物を意味する potio である。この言葉は飲み物に種々の物質を入れた霊薬、媚薬、水薬、毒薬をも示すようになり、英語では poison に変化し、毒素以外の全ての有害物質を示すようになった。例えば、青酸カリ、ヒ素、サリン等は全て毒物である。因に、漢字の「毒」は草の芽生えを表す「生」と子を産む「母」の二つからできており、薬草を使用した強壯剤を意味し、これらを常用すると人体に害が及ぶことから、現在の毒の意味になったと言われている。

4) 恩師との出会いとトキシン研究40年

私は40年間にわたり細菌性トキシンの作用機構の解明を目指して研究を続けて来た。東京大学医科学研究所で恩師の加藤巖教授から学位論文のテーマに「黄色ブドウ球菌ロイコシジンの作用機構に関する研究」をいただいたのが初めである。ロイコシジンは独立した二つの蛋白性コンポーネントからなり、特異的に食細胞を標的として破壊するユニークなトキシンである。二つのコンポーネントをそれぞれ精製・結晶化し、標的細胞のレセプターを決定し、さらに二つのコンポーネントの協調作用による一連の作用機構の解明を行った。これらは、加藤教授と当時助手であった平山壽哉先生（現長崎大学熱帯医学研究所名誉教授）から日々厳しくも温かいご指導をいただいた結果であり、細菌性トキシンの研究に一生を捧げるきっかけになった。

そして、同研究所の細菌感染研究部の助手時代には、加藤巖教授の後任で私のもう一人の恩師である竹田美文教授（現日本細菌学会名誉会員）の腸管出血性大腸菌 O157:H7 の志賀トキシン (Stx) の研究プロジェクトに参加させていただいた。Stx は AB₅ 型トキシンの代表的なものの一つで、私は主に Stx の精製とその致死作用の解明を担当し、幅広いご指導をいただき研究を継続することが出来た。竹田教授のご指導を希望する海外からの研究者も多く、研究室では国際的な学

術交流も盛んで、私も海外留学に興味を持つようになった。そこで、竹田教授にお願いし、米国国立衛生研究所（NIH）のJoel Moss博士のもとに留学する事が出来た。

三人目の恩師である Moss 先生からは、やはり AB₅ 型トキシンの代表格であるコレラトキシンの作用機構に関する研究テーマをいただいた。そして、コレラトキシンの毒性の本体である ADP-リボシル化活性を亢進させる生体内物質の検索・精製・作用機構解明等でご指導をいただいた。ADP-リボシル化活性は加藤巖教授たちがジフテリアトキシンを用いて世界で初めて報告した酵素活性である。Moss 先生も加藤教授たちの論文にとっても刺激を受けたと言っておられた。そして、Moss 先生ご自身もコレラトキシンの ADP-リボシル化活性をもつことを発見するのである。コレラトキシンの ADP-リボシル化活性を亢進させる生体内物質 ARF は、研究の結果、低分子量 G 蛋白質の一つであった。恩師 Joel Moss 博士からは、細菌毒素の毒性は生体内でさまざまに変動しうることを、そして、その毒性を亢進させる物質の有無が、病原性発現に極めて重要であることを教えていただき、その後の私の細菌性トキシンの作用メカニズム解明の研究に大いに役立った。

三人の恩師との出会いが数々の幸運を運んで来てくれた。そして、私の「トキシンの無毒化プロジェクト」の後押しをしてくれた。さらには、私の「トキシンハンターとしての研究人生」の良き理解者であって下さった事に心から感謝申し上げたい。

II. コレラ菌由来の AB₅ 型トキシンに関する研究

1) コレラ発症とコレラトキシン

コレラは rice water (コメのとぎ汁) 状の激しい下痢を主症状とする疾患で、現在でも世界中で多くの患者が出ている。コレラの原因菌は *Vibrio cholerae* (コレラ菌) で、菌体外に産生するコレラトキシン (CT) がこの激しい水様性下痢を引き起こす。CT は 1 個の A サブユニット (CTA) と 5 個の B サブユニット (CTB) からなる AB₅ 型トキシンである (図 1)。毒素原性大腸菌が産生する易熱性毒素 (heat-labile toxin: LT) も CT

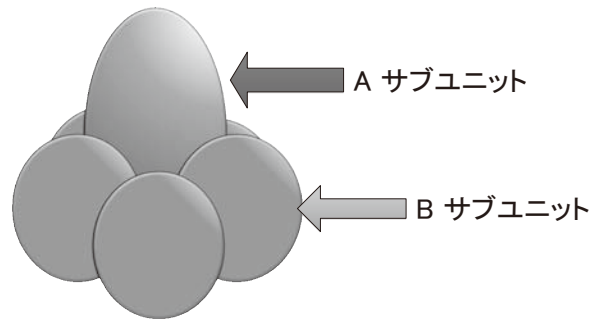


図 1 AB₅ 型トキシン

1 個の A サブユニットと 5 個の B サブユニットから構成される。A サブユニットは毒性に関与する酵素活性を有する。B サブユニットは標的細胞上のレセプターに対する結合能を有する。



コレラ菌のコレラトキシン
毒素原性大腸菌の易熱性トキシン



赤痢菌の志賀トキシン
腸管出血性大腸菌の志賀様トキシン



志賀トキシン産生大腸菌の **SubAB**

図 2 AB₅ 型トキシン・ファミリー

1 個の A サブユニットと 5 個の B サブユニットから構成されるトキシン・ファミリーで、ここでは代表的な 3 種類を示す。1) コレラ菌のコレラトキシン及び毒素原性大腸菌の易熱性トキシン、2) 赤痢菌の志賀トキシン及び腸管出血性大腸菌の志賀様トキシン、3) 志賀トキシン産生大腸菌の SubAB である。

とその構造や機能が極めて似ている AB₅ 型トキシンである (図 2)。CT や LT の A サブユニットは NAD を基質として、標的細胞の Gs 蛋白質を ADP-リボシル化して、この Gs 蛋白質の機能を修飾する。この修飾活性が激しい下痢を引き起こすトリガー (引き金) になっている。ADP-リボシル化活性をもつ細菌性トキシンとしては、他にジフテリア菌のジフテリアトキシン、百日咳菌の百日咳トキシン、緑膿菌のエクソトキシン A、コレラ菌のコリックストキシンなどがある。CTB は標的細胞表層に存在する CT のレセプターであるガングリオシド GM1 という糖脂質に選択的に結合し、CT を標的細胞に吸着させる役割を担っている。標的細胞に接着した CT は細胞内に侵入し、CTA の S-S 結合の還元開裂が起こり二つのフラ

グメントA1 (CTA1) とA2 (CTA2) に分かれる。CTA1がADP-リボシル化活性を有するフラグメントである。このCTA1はすでに紹介した多くのADP-リボシル化トキシンに比べて、予想外にも基質であるNADに対する親和性が約1,000倍も低い。従って、CTA1が標的細胞内でADP-リボシル化活性を発揮するには、NADに対する親和性を上昇させる何か補助因子の存在が必要であると予想される。

2) コレラトキシンの毒性を高める ARF

CTA1のADP-リボシル化活性を上昇させるADP-ribosylation factor (ARF) について行った研究成果を紹介する。ARFは約20kDaの蛋白質で、N末端がミリスチル化されている。ARFはGTP結合能をもち、GTPや非加水分解性のGTPアナログGTP γ SやGpp (NH) pが結合するとCTA1のADP-リボシル化活性を上昇させる。しかし、GDPやそのアナログのGDP β S、あるいはATPやそのアナログのApp (NH) pなどはARFを活性型にすることはできない。GTPが結合した活性型ARFはCTA1に直接結合して、そのADP-リボシル化活性を上昇させる。これは、ARFがCTA1のNADや標的蛋白質に対する親和性を高めることによる[72,73,75,76,79]。ARFのCTA1活性化は種々の界面活性剤で更に亢進する。例えば、低濃度のSDS (0.003%) はCTA1自身のADP-リボシル化活性には全く影響を及ぼさないが、ARFが存在するとCTA1のNADなどの基質に対する親和性を更に上昇させ、Vmaxも大きく上昇させる。また、ジミリスチルホシファチジルコリン (DMPC) とコール酸を併用してもARFによるCTA1のADP-リボシル化活性は亢進する。これらの界面活性剤やリン脂質の促進作用は、アロステリック効果による[69,70,74]。標的細胞にはARFを初めとして、低濃度のSDSやDMPC+コール酸などによって引き起こされる変化と極めて良く似た変化を惹起する未知の物質が存在する可能性もある。当初ARFはCTA1のもう一つの基質であるGs蛋白質の α サブユニット (Gs α) に結合して、ADP-リボシル基をNADから受け取りやすい立体構造に変化させるのではないかという仮説が提唱されていたが、我々の研

究でこれを完全に否定する事が出来た。ARFは直接CTA1に結合して作用するアロステリック・エフェクターであって、Gs α には親和性がない。

3) コレラトキシンの毒性を阻害する ARI

コレラトキシンの毒性を阻害し、無毒化する物質について述べる。ここで紹介するコレラトキシンの無毒化とは、すでによく知られている「抗体を用いて細菌性トキシンの毒性を中和する抗毒素」や「ホルマリン等を用いて細菌性トキシンを変性させて無毒化するトキシノイド化」とは全く異なる。どのように異なるかという点、細菌性トキシンの作用メカニズムに着目し、その毒性発現に必要な酵素活性等を阻害し、毒性を消失させて無毒化するというものである。CTA1のADP-リボシル化活性を特異的に亢進させるARFの作用とは真逆であるCTの毒性を阻害する物質ADP-ribosylation inhibitor (ARI) の研究にエネルギーを注いでいた時、狂牛病等の問題が発生して、必要とする動物の臓器の入手が極めて困難になった。私はCTの作用メカニズムに参与する生体内因子としてのARIの研究を目指していたのであるが、このような理由で研究継続が難しい状況になった。そこで、臓器以外からCTのADP-リボシル化活性を阻害する物質をスクリーニングする事にした。そして、漢方薬に用いる大黄という植物

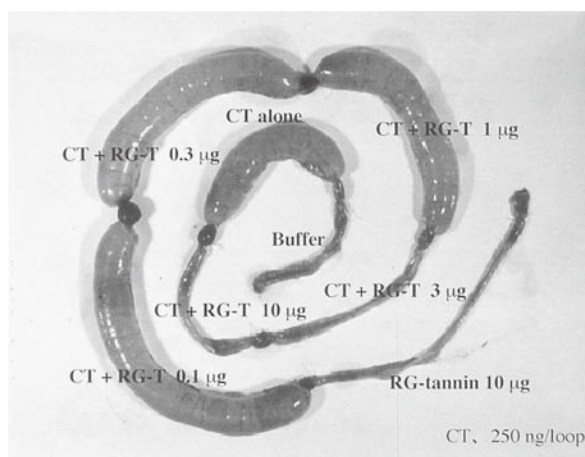


図3 ウサギ腸管ループ法によるコレラトキシンの阻害剤の解析

各ループ当りコレラトキシン250ngと表示の量のRG-Tが同時投与されている。

サンプル投与し、1晩後のループの状態を示す。バッファーのみ、あるいはRG-Tのみ投与のループをコントロールとして示した。

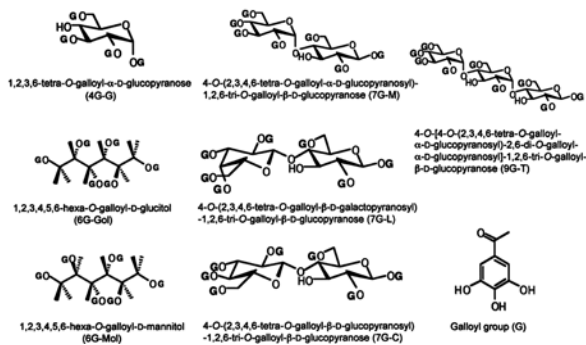


図4 ガロイル基と合成ガロイル化合物

ガロイル基をGで示した。種々の糖にガロイル基を導入した合成ガロイル化合物を作製した。各化合物のGが導入されたガロイル基の位置と数を示す。

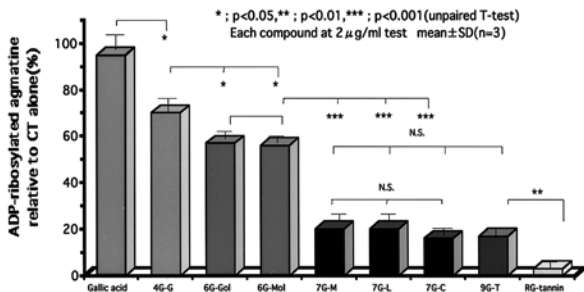


図5 コレラトキシンのADP-リボシル化活性に及ぼす合成ガロイル化合物及びRG-Tの阻害作用

コレラトキシンのADP-リボシル化活性は、基質としてNADとアグマチンを用いて測定した。そこに各種合成ガロイル化合物あるいはRG-Tを添加して、それぞれの阻害活性を解析した。

の抽出液にCTのADP-リボシル化活性を阻害し、ウサギに対するCTの腸管液体貯留活性（下痢活性）等を抑制する天然物質を発見する事が出来た（図3）。その精製を行った結果、rhubarb galloyl-tannin (RG-T) であることを明らかにした。そこで、RG-Tの各種アナログを合成し（図4）、CTのADP-リボシル化活性に対する阻害作用を指標にして、阻害活性に重要な構造の特定を行ったところ、ガロイル基が重要である事、そして、ある骨格に結合したガロイル基はその数に依存して阻害活性が上昇する事を示した（図5）。ガロイル基だけでは阻害活性は無いが、何かの基盤に結合させたガロイル基はCTに対して阻害活性をもつ。例えば、9個のガロイル基をマルトトリオースという糖に結合させた9G-Tは、RG-Tと同程度の阻害活性を示し、CTのもつ種々の活性（ADP-リボ

シル化活性、CHO細胞への形態変化活性、ウサギ腸管での液体貯留活性等）を阻害した。RG-TはCTA1に対するアロステリック阻害剤であった。一方、CTBの標的細胞のガングリオシドGM1への結合には全く影響を及ぼさなかった[37]。CTのADP-リボシル化活性を阻害する物質については、RG-Tなどの天然物質や9G-Tなどの合成ガロイル化合物以外に、果物や植物由来のポリフェノールもCTに対する阻害作用を有することを発見し、その阻害作用をCTの標的細胞への結合、そして細胞内への侵入の2つの異なるステップに着目して解析した[28,36]。例えば、リング由来のポリフェノール applephenon (AP) やホップ由来のポリフェノール (HBT) はCTA1のADP-リボシル化活性を阻害するだけでなく、CTの標的細胞への結合阻害を起こした。これは標的細胞の受容体であるガングリオシドGM1へCTのBサブユニットが結合するのを阻害しているため、この点が大黄由来のRG-Tの阻害作用とは全く異なる特徴であった。AP、HBTが結合したCTは標的細胞内への取込みが当然阻害された。APやHBTで処理したCTは250kDa以上の複合体を形成し、沈殿させる事が出来るが、RG-T処理ではそのような複合体形成は起こらなかった。しかし、ブドウ由来のポリフェノール resveratrol (ResV) は、RG-Tと同様にCTのAサブユニットのもつADP-リボシル化活性を阻害するだけで、CTのBサブユニットとレセプターとの結合には影響しないものの、CTの標的細胞内への取込みを阻害するという興味深い作用を示した[9]。このことから、CTの細胞内侵入にはBサブユニットとレセプターの結合、そして、Aサブユニットを介した細胞への未知の接近・吸着ステップが必要なことが示唆された。

これまで海外の研究グループがコレラ発症を阻止する目的で、大量のガングリオシドGM1を生体に投与し、CTのBサブユニットが標的細胞の受容体に結合しないようにする方法を試みたが、予想しない副作用が出て計画は失敗した。それは生体内でガングリオシドGM1に対する抗体が産生され、その抗体が神経系に豊富に存在するガングリオシドGM1に作用してギラン・バレー症候群という神経系の病気を誘発したためである。我々の方法は、これらの研究とまったく異なるも

のである。つまり、CTのAサブユニットがもつ酵素活性を、身体に優しい天然物質を低濃度で用いて、コレラ発症を阻止しようと言うものであり、これまでのところ、副作用は報告されていない。

4) 無毒化コレラトキシンの利用

無毒化CTアジュバントの作製にAPを利用する方法を考案した[14]。ADP-リボシル化活性をリングのAPで阻害して毒性の無いCTを作製し、ヒト用の新しい効果的なアジュバントとしての可能性を調べた。CT自体が効果的なアジュバントであることは既に知られていたが、その毒性が原因でヒトへの使用が困難であった。これまでも毒性の減弱したミュータントCTを用いる試み等をして来た[19,50,51,66]が、ここではAPを用いて無毒性のCTを作製し、それを新しい効果的で安全な経鼻粘膜ワクチンに利用しようとして計画した。マウスに対してOVAとCTを経鼻的に免疫する際に、AP存在下と非存在下で比較したところ、AP存在下の方が顕著に炎症反応が軽減しており、総抗体量とOVA特異的なIgE抗体が減少していた。しかし、粘膜と全身性のOVA特異的な抗体のレベルは維持されていた。更に、APは嗅覚神経と上皮組織におけるCTの蓄積を減少させていた。以上から、至適濃度のAPはCTを無毒化するだけでなく、CTのアジュバントとしての性質には全く影響を及ぼさないの、ヒトへの利用が十分に可能であることが示された[14]。

Ⅲ. 腸管出血性大腸菌由来のAB₅型トキシンに関する研究

1) O157 STECの産生するStx

志賀様トキシン (Stx) は腸管出血性大腸菌が産生するAB₅型のトキシンで、1個のAサブユニットと5個のBサブユニットから構成されている。腸管出血性大腸菌のうち、Stxを産生する大腸菌をShigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) という。これまで、鮮血便を伴う出血性大腸炎を起こし、さらに溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を併発して重症化させた菌株のほとんどはO157:H7という血清型で、これをO157 STECという。竹田美文教授の研究チームが初めて、Stx

のAサブユニットがRNA *N*-グリコシダーゼという酵素活性を有していることを報告した[77]。この酵素活性によって28SリボソームRNAを失活させ、標的細胞の蛋白合成を阻害し、細胞障害等を起こす。一方、Bサブユニットは標的細胞のレセプターである糖脂質のGb3への結合能を有しており、トキシン全体を標的細胞に接着させる役割を担っている[18]。Stxは大きく2種類に分類される。Stx1は赤痢菌の産生する志賀トキシンとアミノ酸配列が同一である[80]。Stx1は菌体内に留まり、溶菌的にしか菌体外に出ない。一方、Stx2は志賀トキシンとのアミノ酸配列の相同性が約55%で、生物学的性状はStx1と類似している。しかし、菌体外に分泌されるなど、その物理化学的性状や免疫学的性状はStx1とは大きく異なる。我々はStx2の菌体外への移行メカニズムを詳細に解析して報告している[15,23,24]。腸管内で産生されたStxは腸管粘膜標的細胞に結合して、出血性下痢を特徴とする消化器症状を起こすだけでなく、血中に侵入して微小血管内膜に障害を与え、腎臓をはじめ諸臓器に機能不全を起こす。特に合併症としてHUSが起こる事が多く社会問題になっている。HUSにはStx1よりもStx2の方が関与しているという報告が多いが、我々の研究により、さらに一酸化窒素を分解して無毒化する一酸化窒素還元酵素 (NO reductase) が重要である事がわかった[2,5]。Stx2とNO reductaseの両方を有する菌株がHUSを起こす確立が高いことが示された。NOは食細胞のマクロファージが産生する殺菌物質であるが、NO reductaseによりNOを分解して、感染成立をより確実にする。STECが持つNO reductaseの遺伝子には2種類ある。一つは酵素活性に必要な遺伝子構造を全て保持し、その遺伝子産物がNO reductaseの活性を有する完全型で、主にStx2のみを産生する菌株に多い。もう一つは遺伝子構造に欠失があるため、その遺伝子産物はNO reductase活性を持たない不完全型で、Stx1産生株、あるいはStx1とStx2の両方を産生する菌株に多い。我々の研究はStx2とNO reductaseとの連携を初めて明らかにしただけでなく、HUS発症にはStx1ではなく、Stx2とNO reductaseの組合せが重要であること、そして、この両者を

有する菌株には特に嚴重な対処が必要であることを示している。因に、1996年に日本を震撼させたO157 Sakai株のHUS発症率は1.4%で、Stx1とStx2の両方を産生し、NO reductaseは持っていない。一方、2006年にアメリカ合衆国でハウレンソウを原因食として集団食中毒を起こしたO157のHUS発症率は極めて高く約15%であった。この菌株はStx2とNO reductaseの両方を産生していた。さらにO157以外の血清型を持つSTECでもStx2とNO reductaseの組合せが重症化に関与することが示唆される。例えば、2011年に富山県、福井県、神奈川県で起きたユッケによる集団食中毒の原因菌はO111 STECで、HUS発症率は約20%で、Stx2とNO reductaseを産生する株である。また、同年、ドイツで起きた有機栽培スプラウトによる集団食中毒の原因菌はO104 STECで、HUS発症率は約24%で、Stx2とNO reductase産生株である。NOは血管内皮細胞でも産生され、血管内皮機能を調節している。例えば、血管拡張作用や血小板凝集抑制作用等である。動脈硬化を起こした血管では、血管内皮機能が低下しており、NOの産生も低下して、血管弛緩の悪化、血小板凝集の亢進などが起きているという。STECが産生したNO reductaseがNO濃度を下げ、このような血管内皮機能の攪乱を引き起こし、血管内膜への障害を増産されたStx2と連携して増強させている可能性が考えられる。

2) Stxの無毒化

Stx-1のRNA N-グリコシダーゼ活性を阻害する物質のスクリーニングをした結果、ホップの抽出物に同活性を強力に阻害する物質(HBT)が存在することを見出した(図6)。構造解析の結果、このHBTは高度に重合したカテキン類で、緑茶などに含まれる一般的なポリフェノールであるエピガロカテキンガレートとは異なる物質であった。種々の解析の結果、HBTは直接Stx-1のAサブユニットに結合し、リボゾームRNAとの結合を阻害している事がわかった。HBTはStx-1のペロ細胞に対する細胞毒性も濃度依存的に阻害し、さらにウサギ腸管に対するStx-1の腸管液体貯留活性(下痢活性)等も阻害した。また、HBTはマウスに経口投与しても毒性は見ら

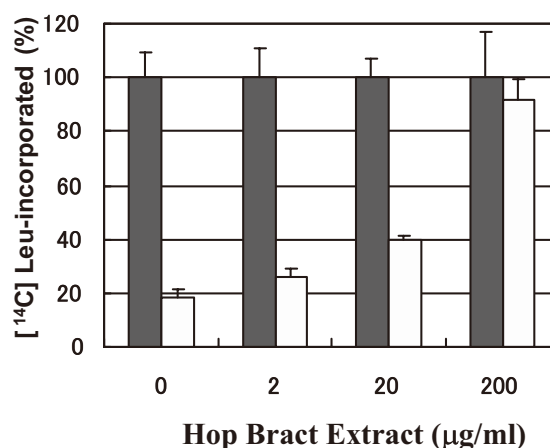


図6 志賀トキシンに対するHBTの阻害作用

志賀トキシンのRNA N-glycosidase阻害活性をウサギreticulocyte lysatesと放射活性のロイシンを用いて解析した。色付きバーは志賀トキシン非存在下、無色のバーは志賀トキシン存在下を示す。それぞれに表示した量のHBTを添加し、蛋白合成を放射活性のロイシンの取込みで評価した。添加したHBTの量に依存して志賀トキシンのRNA N-glycosidase阻害活性が減弱し、蛋白合成が回復している。

れず、ストレプトマイシンなどの抗生物質の殺菌効果に対しても影響を与えなかった。以上からHBTは天然から得られた安全な物質であり、抗生物質との併用も可能である事がわかった。しかし、Stx-2に対してはHBTは有効な阻害効果を発揮出来なかった。以上から、HBTはStx-1に対して特異的に作用する阻害剤である事、そして、種々の蛋白質に非特異的に作用する物質ではない事がわかった。長年Stx-2に対する特異的な阻害剤は報告されていなかったが、我々はドラッグリポジショニングという概念のもと、既知の臨床薬等のスクリーニングを行った所、抗癌剤やアルツハイマー病に用いられるBryostatin 1がStx-2の細胞毒性を特異的に阻害する事を発見した。現在、腸管液体貯留活性(下痢活性)への阻害効果を解析中である。この薬剤はStx-1には無効であった。

IV. Non-O157 STEC由来のAB₅型トキシンに関する研究

1) Non-O157 STECの産生するSubAB

これまで出血性大腸炎、さらにHUSや脳症を併発し重症化を招いた菌株のほとんどは、O157:H7という血清型であったので、これを

O157 STECと呼ぶことはすでに述べた。しかし、2000年以降、血清型がO157:H7以外の菌株(non-O157 STEC)の感染が劇的に増加してきた。その事例もすでに紹介した。特に、ヨーロッパ、米国、日本等では、このnon-O157 STECの重要性が急速に認識されるようになった。2004年にSubtilase cytotoxin (SubAB) という新しいAB₅型トキシンが、non-O157 STECの一つであるO113:H21という菌株から発見された[32]。この菌株はオーストラリアでHUSを発症した患者から分離されたものである。SubABも1個のAサブユニットと5個のBサブユニットから構成されている[20]。SubABのAサブユニットは炭疽菌のsubtilase-like serine proteaseと約26%のホモロジーを有するserine proteaseであった。我々も2005年に千葉大学医学部附属病院で分離されたnon-O157 STECのO29 STECからSubABのクローニングに本邦で初めて成功し、精製SubABを得た[22]。これまでの疫学的調査から、SubABはSTECの約25%が産生しているが、Stxを産生しない他の各種病原性大腸菌にはSubABの産生は見られない。また、non-O157 STECの約55%がSubABを産生するが、O157 STECでSubABを産生する菌株は極めて少ない。SubABを産生するSTECのほとんどは、Stx2を産生するが、Stx1を産生する菌株は非常に少ない[4,11,12]。

2) SubABのマウスに対する致死活性

10 μgの精製SubABを腹腔に投与されたマウスは、48-72時間以内に全数が死亡した。SubABの標的臓器を特定するためにSubAB投与後48時間経過したマウスを観察すると、小腸に顕著な出血が見られた。また、肝臓の色が淡く変化しており、脾臓の萎縮、腎障害(メサングウムの増加)などが観察された。小腸の病理組織学的解析により、SubAB投与により、好中球の浸潤と絨毛・筋粘膜・筋肉層に出血がみられた(図7)。さらに、SubAB投与マウスでは、血小板減少、プロトロンビンタイム(PT)と活性化部分トロンビンタイム(APPT)の延長を特徴とする血液凝固異常を呈しており、これらは血液検査による解析結果とも一致した。また、種々のサイトカインの

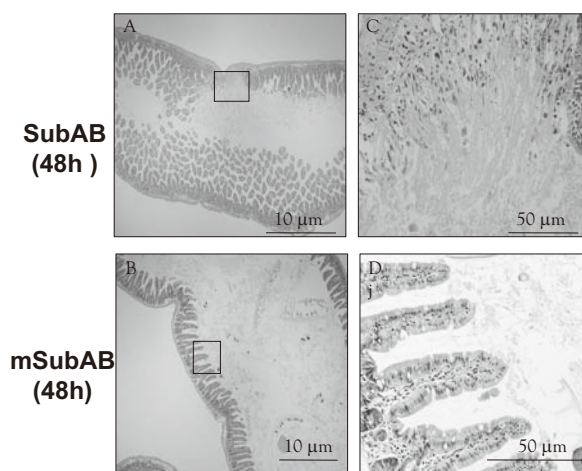


図7 SubAB投与マウスの小腸の病理組織学的解析写真

SubAB投与後48時間経過したマウスの小腸の病理組織学的解析の写真を示す。

SubABの投与によって、好中球の浸潤と、絨毛、筋粘膜、筋肉層に出血が見られる。無毒性のmutant SubAB (mSubAB) 投与マウスとSubABを投与しないコントロールマウスでは、このような現象は見られない。

顕著な誘導も観察された。以上から、SubAB投与マウスの死は、消化管の血液凝固阻害と炎症を伴う大量出血が原因であると推察した[7]。現在、non-O157 STEC感染症におけるSubABの腸管炎症や血小板減少のメカニズムの解明、さらにはStx2存在下での病態の増悪メカニズムなどの解明を進めている。

3) SubABのマクロファージに対する殺菌活性阻害作用

好中球やマクロファージ等の食細胞の二大殺菌システムは、活性酸素と一酸化窒素(NO)である。ここでは、マクロファージの殺菌活性に寄与するNOとSubABとの関係について述べる。LPSが誘導性NO合成酵素(iNOS)に作用しNOを産生させる事は以前から知られていたが、そこにSubABが存在するとNO産生が阻害される事をみいだした。このSubABによる阻害メカニズムは、LPSによって発現されるiNOS mRNAをSubABが阻害しているためであり、その結果、LPS誘導性iNOSの発現が阻害されることがわかった。さらに、LPS誘導性iNOS mRNAの発現には、NF-κBの活性化が重要である事も知られているので、これに対するSubABの影響を

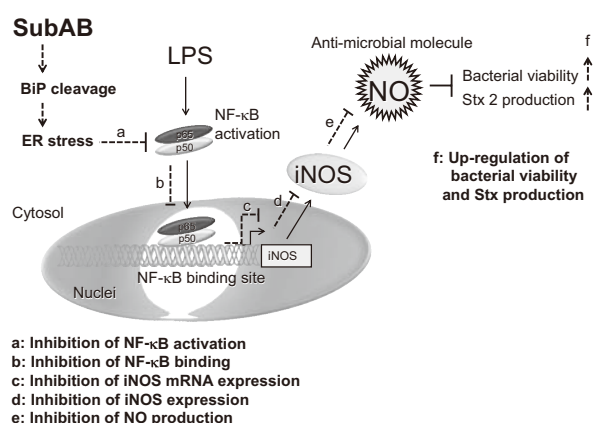


図8 SubABがもつマクロファージのNO産生への阻害機構

SubABのLPS誘導性iNOSの阻害機構は、次のように要約される。

SubABのERストレスがLPS誘導性NF-κBの活性化を抑制する (a)。NF-κBの抑制がNF-κBのiNOSプロモーターへの結合を阻害し (b)、その結果、iNOS mRNAの発現の阻害 (c)、iNOSタンパクの発現阻害 (d)、そして、マクロファージのNO産生阻害 (e) へと続く。NOの産生抑制は細菌の生存率上昇を引き起こし、Stx2の菌体あたりの産生量を上昇させる (f)。詳細は本文を参照。

解析した所、SubABは時間依存性にNF-κBの活性化を阻害する事がわかった。これらの結果から、SubABはLPS誘導性NF-κBの活性化を阻害し、NF-κBのiNOSプロモーターへの結合を阻害する。そして、iNOS mRNAの発現阻害を起こし、iNOS蛋白の発現阻害、さらに、マクロファージのNO産生阻害へと導く事を明らかにした[3](図8)。SubABによるLPS誘導性NO産生の抑制は、細菌の宿主防衛機構を欺く新しい戦略の一つである可能性が示された。NOはSTECのStx2産生を抑制する事はすでにStxのところでも述べたが、SubABによるNO産生阻害、つまり、NO濃度を減少させる事がSTECのStx2産生を促進させることも証明した[3]。このようなSubABとStx2の連携作用を具体的に示したのは我々が初めてである。SubABを産生するnon-O157 STECは、主としてStx2を産生する事から、SubABおよびStx2産生株、さらにはO157 STECのところでも述べたNO reductaseの3者を保有する菌株には特に嚴重に注意する必要があると思う。現在、好中球の活性酸素産生に及ぼすSubABの効果の解析を進めている。

4) SubABの細胞障害活性とレセプター

精製SubABはアフリカミドリザルの腎臓由来細胞 (Vero細胞) に対して、1 μg/ml以上の濃度で空胞形成を誘導し、24時間で細胞を崩壊させた。又、空胞形成が認められない低濃度 (1 ng/ml以上) で、細胞増殖を抑制し、48時間で細胞の円形化を起こした。また、この低濃度で2時間以内にロイシンの取り込みが阻害されており、蛋白合成阻害が起きていることを明らかにした。つまり、SubABは少なくとも2種類の細胞障害活性を持っていることを明らかにした[22]。更に、細胞周期への影響を調べたところ、SubABはVero細胞の増殖をG1期で停止させることが分かった。これはG1からS期への移行に必要なcyclin D1が、リン酸化されてプロテアソームで分解されることに依存していると推察された[17]。SubABの初期作用を解明するために、まず、SubAB処理により形態変化 (空胞化) を起こすVero細胞膜上のSubAB受容体の同定を行った。マス解析の結果、integrin α2β1のN-link糖鎖部分を認識することを明らかにした。β1 integrin siRNA処理は、Vero細胞に於いて、α2β1 integrinのヘテロ二量体の形成を抑制し、更に、SubABによる細胞の空胞化を阻害した。以上の結果から、SubABが細胞障害を引き起こす際、α2β1 integrinを機能的宿主受容体として認識している事を明らかにした[25]。また、SubABの細胞致死に直接関与するレセプターの検索をヒト培養細胞であるHeLa細胞の細胞膜上で行った。免疫沈降、LC-MS/MSに依る解析の結果、SubABはHeLa細胞膜上のintegrin α2β1に加えて、NG2, Met, L1CAMにも結合していた。また、SubABによる細胞致死活性を、siRNAによるレセプター蛋白質のノックダウン細胞を用いて解析した結果、やはり、integrin α2β1がSubABによる細胞致死作用に関与するレセプターであることを明らかにした[6]。

5) SubABの小胞体ストレスとアポトーシス

SubABは標的細胞内に侵入し、小胞体 (ER) のシャペロン蛋白質BiPを切断し、ERストレスによる細胞死を誘導すると考えられていた[16,21,26]。ERにおいて、BiPはER膜通過時に

おける蛋白質のフォールディングの制御を担う重要な蛋白質で、ERストレス障害の軽減機構に関与することが知られている。そこで、SubABによる細胞致死機構を詳細に解析した。SubABのAサブユニットのプロテアーゼ活性によりシャペロン蛋白質BiPは44 kDaと28 kDaの2つの断片に切断され、Unfolding proteinの蓄積による小胞体ストレスを引き起こし、細胞障害を誘導すると考えた。実際にBiPの切断領域の変異体を過剰発現させた細胞においては、SubABによる細胞毒性が回避される[26]。Vero細胞を用いた実験から、SubABの処理によりミトコンドリアから細胞質へチトクロームcの放出が認められたので、ミトコンドリア障害を介した細胞死であると推察した。加えて、カスパーゼ阻害剤は、SubABの細胞致死活性を阻害することができたが、チトクロームcの放出を抑制しなかった。このことから、SubABによるVero細胞の細胞死の機序は、ミトコンドリアからのチトクロームcの放出、放出されたチトクロームcによるapoptosomeの形成、そして、これに続くカスパーゼに依存したアポトーシスである事が明らかとなった[13]。

HeLa細胞を用い、更に詳細な致死機構の解析を行った。その結果、SubAB処理した細胞におけるミトコンドリアからのチトクロームcの放出には、Bcl2 family蛋白質であるBaxとBakの構造変化を伴う複合体形成が寄与していることを、Bax/BakのsiRNAによるBax/Bakの発現抑制細胞を用いて証明した。また、SubABにより誘導されるERストレスシグナル関連蛋白質Irel α 、CHOP、JNK1のsiRNAによる発現抑制実験では、細胞死、チトクロームcの放出、カスパーゼの活性化はいずれも変化がなかった。これらの結果から、SubABのERストレスによる細胞死のメカニズムは、ミトコンドリアの膜障害（Bax/Bak複合体の形成）を介したチトクロームcの放出、それに伴うapoptosomeの形成、そして、カスパーゼの活性化によるアポトーシスであることが明らかとなった[10]。

最近、我々は、SubABによるBiPの切断に伴い、ERストレスセンサー蛋白質の一つである、double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK) を介したシグナル伝達

が、カスパーゼの活性化依存性のアポトーシス機構を制御していることを明らかにした。つまり、PERKの発現抑制は、SubABによるアポトーシス誘導伝達機構（Bax/Bakの構造変化、チトクロームcの放出、カスパーゼの活性化）を抑制する。これはPERKをノックダウンしたMEF細胞でも同様の結果を得ており、SubABのBiPの切断によるアポトーシスの初期シグナルがPERKを介した伝達機構であることを示すものである[1]。

つまり、SubABはERストレスを起こし、ERストレスセンサー蛋白質の一つであるPERKを活性化する。このPERK活性化が、ミトコンドリア膜のBax/Bakの構造変化を誘導し、チトクロームcの放出を起こし、遊離したチトクロームcがapoptosomeの形成を促進し、カスパーゼを活性化して、アポトーシスシグナルの引き金となる(図9)。また、興味深い事に、26Sプロテアソーム阻害剤でSubABによる初期アポトーシスシグナルの阻害が起こることから、ユビキチン・プロテアソーム系で分解を受けるある種の細

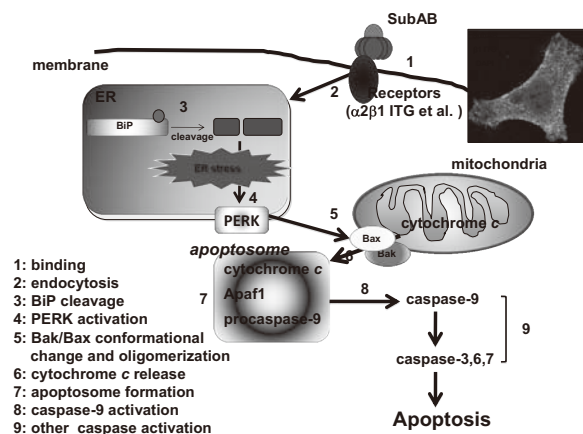


図9 SubABの細胞障害機構

SubABによる細胞障害のメカニズムを示す。

1. SubABの標的細胞のレセプター $\alpha 2 \beta 1$ integrinへの結合,
2. エンドサイトーシスによる標的細胞内侵入,
3. 小胞体のシャペロン蛋白質BiPの切断によるERストレスの惹起,
4. ERストレスセンサー蛋白質PERKの活性化,
5. ミトコンドリア膜のBax/Bakの構造変化の誘導,
6. ミトコンドリアからのチトクロームcの遊離を促進,
7. 遊離したチトクロームcがapoptosomeの形成を促進,
8. apoptosomeによるカスパーゼ9の活性化,
9. それに続く一連のカスパーゼの活性化によるアポトーシスの惹起。

詳細は本文を参照。

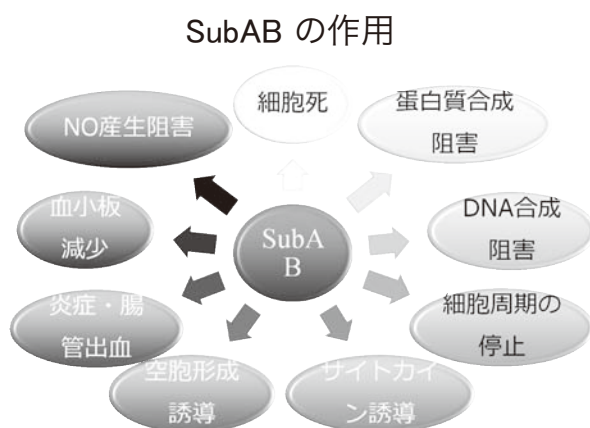


図10 SubABが示す多彩な作用

SubABは細胞死以外に表示したような多彩な現象を引き起こすトキシンである。ここでは示していないが、Stx2との連携も明らかにした。詳細は本文及びSubABの文献を参照。

胞致死責任蛋白質が、SubABによるアポトーシスシグナルを亢進する重要な因子であることも明らかにした[1]。SubABが引き起こすBiP切断によるERストレスと細胞死により、SubAB投与マウスで観察された多臓器不全や致死現象を説明するには、まだまだ解明しなければならない事柄が多いが、現在、細胞レベルと生体レベルの両サイドからSubABの詳細なメカニズムの解明を進めている(図10)。さらに、non-O157 STEC感染症においては、他の重要な因子であるStx2やNO reductaseとの相互関係の解明も進めている。

6) SubABの無毒化

SubABの細胞障害活性を指標にして、SubABの無毒化を試みた。既に述べたドラッグリポジショニングという概念のもと、既知の臨床薬等のスクリーニングを行った。まず、Protein kinase C (PKC) の活性化剤PMAにSubABに対する阻害効果を見いだしたので、PKC活性化作用のある薬剤のスクリーニングを行った結果、皮膚癌に対する局所治療薬であるIngenol-3-angelateと、抗癌剤やアルツハイマー病への治療薬であるBryostatin 1が見つかった。Bryostatin 1はStx-2にも阻害効果がある事は既に述べたが、non-O157 STEC感染症においては、SubABとStx-2の両方を産生する菌株が要注意であるので、Bryostatin 1は極めて有望な無毒化剤の可能性が示唆された。また、種々の基礎実験データからSubABへ

の無毒化作用が示唆されたステロイド剤のスクリーニングを行った結果、DexamethasoneとMethylprednisoloneがSubABの細胞障害活性を阻害した。一方、インドメタシン等の非ステロイド性抗炎症薬にはSubABへの阻害効果は現在のところ見つかっていない。ここで見つけた4種類のSubAB無毒化剤について、さらに*in vivo*の実験を計画中である。

IV. おわりに

本稿では、「病原細菌のAB₅型トキシンの作用機構等に関する研究」と「AB₅型トキシンの無毒化プロジェクト」(図11)を中心にして述べたが、「私のトキシン研究40年」と題するならば、ここでは紹介出来なかった研究が多数ある。それはAB₅型トキシンではないが、冒頭でも述べたように、恩師の加藤巖教授から学位論文のテーマとしていただいて始めた「黄色ブドウ球菌ロイコシジンの作用機構に関する研究」である[35,59,67,78,81,84-87]。このトキシンはそれぞれ機能が異なる2成分からなるトキシンで、AB₅型トキシンの研究に入っていく上でも極めて重要な意味があった。さらに現在行っているコレラ菌が産生するADP-リボシル化活性を有するコリックストキシンもAB₅型トキシンではないが、極めて興味深い作用を示す[8]ことがわかってきた。さらに、トキシンの応用研究に関しては、黄色ブドウ球菌のαトキシンの無毒化[27]やピロリ菌のVacAトキシンの無毒化[29]など



コレラ菌のコレラ毒素

RG-T, 9G-T, Applephenone, Resveratrol



腸管出血性大腸菌の志賀様毒素

Stx1:HBT, Stx2: Bryostatin 1



志賀毒素産生大腸菌の SubAB

Bryostatin 1, Ingenol-3-angelate, Dexamethasone, Methylprednisolone

図11 AB₅型トキシンの無毒化剤

3種類のAB₅型トキシンに対する我々が発見した無毒化剤を示した。

の研究もある。他にも多くの興味深い細菌性トキシン[30,31,38,39,42-44,46,48,55,60,63,68,71,82,83]やADP-リボシル化活性[33,34,40,41,45,47,49,52-54,56-58,61,62,64,65]の研究を行った。また、研究活動の一環として是非紹介しておきたいのは、全国の小中高校生等を対象にした「ミクロの世界からのメッセージ」と題する無料出張講演活動である。2004年から開始したこの活動は今年で13年目を迎えた。北は北海道新ひだか町の三石小学校から、南は沖縄県宮古島の平良中学校までの全国300校以上で実施し、受講生数は80,000人を超えた。さらに、実際に細菌学の実験を体験してもらう活動も、2006年から毎年約50名の小中高校生を対象にして当研究室で実施している。将来、細菌学を目指す人材が多数登場する事を期待している。

謝 辞

本研究を進めるにあたり最も重要な指針を絶えず与えて下さった平山壽哉教授、Joel Moss博士、竹田美文教授、加藤 巖教授に特別な謝意を表します。本研究は以下に示す研究室のスタッフ、大学院生、研究生、国内外の共同研究者の多くの方々によりなされたものであり、ここに心より感謝の意を表します。

(敬称略・順不同)

盛永直子, 玉山詩枝子, 三宅真実, 清水 健, 八尋錦之助, 津々木博康, 小倉康平, 松浦 玄, 古川 健, 永澤明佳, 崔 玉仙, 岩丸祥文, 斎藤高雄, 神谷重樹, 加藤治郎, 外川 明, 塩原正之, 笠松厚志, 黒田文伸, 大井浩資, 松浦大輔, 村野彰行, 田頭素行, 井上雅仁, 太田優子, 市村公敏, 竹内裕紀, 松本明郎, 桑原 聡, 岩瀬博太郎, 中島裕史, 中谷晴昭, 丹沢秀樹, 宮崎 勝, 野村文夫, 山崎伸二, 西谷 肇, 平山壽哉, Joel Moss, 竹田美文, 加藤 巖

SUMMARY

Bacterial AB₅ toxins are proteins, produced by pathogenic bacteria including of *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, and enterohaemorrhagic *Escherichia*

coli, which are usually released into the extracellular medium and cause disease by killing or altering the metabolism of target eukaryotic cells. The toxins are usually composed of one A subunit (a toxic domain) and five B subunits (a receptor-binding domain). This article overviews the characteristics and mode of actions of AB₅ toxins including cholera toxin, Shiga-like toxin, and subtilase cytotoxin, and highlights a project on the novel inhibitors against these bacterial AB₅ toxins.

文 献

- 1) Yahiro K, Tsutsuki H, Ogura K, Nagasawa S, Moss J, Noda M. Regulation of Subtilase cytotoxin (SubAB)-induced cell death by a PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-dependent proteasome pathway in HeLa cells. *Infect Immun* 2012; 80: 1803-14.
- 2) Shimizu T, Tsutsuki H, Matsumoto A, Nakaya H, Noda M. The nitric oxide reductase of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophage. *Mol Microbiol* 2012; 68: 480-90.
- 3) Tsutsuki H, Yahiro K, Suzuki K, Suto A, Ogura K, Nagasawa S, Ihara H, Shimizu T, Nakajima H, Moss J, Noda M. Subtilase cytotoxin enhances *Escherichia coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF-kappaB activation. *Infect Immun* 2012; 80: 3939-51.
- 4) Bentancor A, Rumi MV, Carbonari C, Gerhardt E, Larzabal M, Vilte DA, et al. Profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. *Vet Microbiol* 2012; 156: 336-42.
- 5) Shimizu T, Ohta Y, Tsutsuki H, Noda M. Construction of a novel bioluminescent reporter system for investigating Shiga toxin expression of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Gene* 2011; 478: 1-10.
- 6) Yahiro K, Satoh M, Morinaga N, Tsutsuki H, Ogura K, Nagasawa S, Nomura F, Moss J, Noda M. 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: 617-27.
- 7) Furukawa T, Yahiro K, Tsuji AB, Terasaki Y, Morinaga N, Miyazaki M, Fukuda Y, Saga T, Moss J, Noda M. Fatal hemorrhage induced by subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 2011; 50: 159-67.
- 8) Ogura K, Yahiro K, Tsutsuki H, Nagasawa S, Yamasaki S, Moss J, Noda M. Characterization of cholix toxin-induced apoptosis in hela cells. *J Biol*

- Chem 2011; 286: 37207-15.
- 9) Morinaga N, Yahiro K, Noda M. Resveratrol, a natural polyphenolic compound, inhibits cholera toxin-induced cyclic AMP accumulation in Vero cells. *Toxicon* 2010; 56: 29-35.
 - 10) 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), Irelalpha or JNK signaling. *Microb Pathog* 2010; 49: 153-63.
 - 11) Irino K, Vieira MA, Gomes TA, Guth BE, Naves ZV, Oliveira MG, et al. Subtilase cytotoxin-encoding subAB operon found exclusively among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 988-90.
 - 12) Wu Y, Hinenoya A, Taguchi T, Nagita A, Shima K, Tsukamoto T, et al. Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan. *J Vet Med Sci* 2010; 72: 589-97.
 - 13) Matsuura G, Morinaga N, Yahiro K, Komine R, Moss J, Yoshida H, Noda M. Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces apoptosis in vero cells via mitochondrial membrane damage. *Infect Immun* 2009; 77: 2919-24.
 - 14) Yoshino N, Fujihashi K, Hagiwara Y, Kanno H, Takahashi K, Kobayashi R, Inaba N, Noda M, Sato S. Co-administration of cholera toxin and apple polyphenol extract as a novel and safe mucosal adjuvant strategy. *Vaccine* 2009; 27: 4808-17.
 - 15) Shimizu T, Ohta Y, Noda M. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect Immun* 2009; 77: 2813-23.
 - 16) Smith RD, Willett R, Kudlyk T, Pokrovskaya I, Paton AW, Paton JC, Lupashin VV. The COG complex, Rab6 and COPI define a novel Golgi retrograde trafficking pathway that is exploited by SubAB toxin. *Traffic* 2009; 10: 1502-17.
 - 17) 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: 921-29.
 - 18) Hanashima T, Miyake M, Yahiro K, Iwamaru Y, Ando A, Morinaga N, Noda M. Effect of Gb3 in lipid rafts in resistance to Shiga-like toxin of mutant Vero cells. *Microb Pathog* 2008; 45: 124-133.
 - 19) Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Sasaki K, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Shimizu T, Taniguchi K, Noda M. A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. *Vaccine* 2008; 26: 2092-9.
 - 20) Byres E, Paton AW, Paton JC, Lofling JC, Smith DF, Wilce MC, et al. Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature* 2008; 456: 648-52.
 - 21) 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: 1093-101.
 - 22) Morinaga N, Yahiro K, Matsuura G, Watanabe M, Nomura F, Moss J, Noda M. Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2007; 75: 488-96.
 - 23) Shimizu T, Sato T, Kawakami S, Ohta T, Noda M, Hamabata T. Receptor affinity, stability and binding mode of Shiga toxins are determinants of toxicity. *Microb Pathog* 2007; 43: 88-95.
 - 24) Shimizu T, Kawakami S, Sato T, Sasaki T, Higashide M, Hamabata T, Ohta T, Noda M. The serine 31 residue of the B subunit of Shiga toxin 2 is essential for secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2007; 75: 2189-200.
 - 25) Yahiro K, Morinaga N, Satoh M, Matsuura G, Tomonaga T, Nomura F, Moss J, Noda M. Identification and characterization of receptors for vacuolating activity of subtilase cytotoxin. *Mol Microbiol* 2006; 62: 480-90.
 - 26) 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: 548-52.
 - 27) 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: 215-24.
 - 28) Morinaga N, Iwamaru Y, Yahiro K, Tagashira M, Moss J, Noda M. Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of cholera toxin in vero cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 23303-9.
 - 29) Yahiro K, Shirasaka D, Tagashira M, Wada A, Morinaga N, Kuroda F, Choi O, Inoue M, Aoyama N, Ikeda M, Hirayama T, Moss J, Noda M. Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Helicobacter* 2005; 10: 231-9.
 - 30) Murano A, Morinaga N, Iwamaru Y, Yahiro K, Tagashira M, Moss J, Tanzawa H, Noda M. Acidic conditions enhance bactericidal effects of sodium bisulfite on *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2005; 10: 132-5.
 - 31) Yahiro K, Wada A, Yamasaki E, Nakayama M, Nishi Y, Hisatsune J, Morinaga N, Sap J, Noda M,

- Moss J, Hirayama T. Essential domain of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem* 2004; 279: 51013-21.
- 32) Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H, Paton JC. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med* 2004; 200: 35-46.
- 33) Shimizu S, Nomura F, Tomonaga T, Sunaga M, Noda M, Ebara M, Saisho H. Expression of poly (ADP-ribose) polymerase in human hepatocellular carcinoma and analysis of biopsy specimens obtained under sonographic guidance. *Oncol Rep* 2004; 12: 821-5.
- 34) Shin HW, Morinaga N, Noda M, Nakayama K. BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 5283-94.
- 35) Morinaga N, Kaihou Y, Noda M. Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 81-90.
- 36) Saito T, Miyake M, Toba M, Okamatsu H, Shimizu S, Noda M. Inhibition by apple polyphenols of ADP-ribosyltransferase activity of cholera toxin and toxin-induced fluid accumulation in mice. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 249-55.
- 37) Oi H, Matsuura D, Miyake M, Ueno M, Takai I, Yamamoto T, Kubo M, Moss J, Noda M. Identification in traditional herbal medications and confirmation by synthesis of factors that inhibit cholera toxin-induced fluid accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3042-6.
- 38) Miyashita T, Shimamoto Y, Nishiya H, Koshibu Y, Sugiyama H, Ono Y, Satoh T, Haraoka H, Nakano J, Ohta K, Sato T, Morinaga N, Noda M. Destructive pulmonary embolism in a patient with community-acquired staphylococcal bacteremia. *J Infect Chemother* 2002; 8: 99-102.
- 39) Arii J, Tanabe Y, Miyake M, Mukai T, Matsuzaki M, Niinomi N, Watanabe H, Yokota Y, Khono Y, Noda M. Clinical and pathologic characteristics of nontyphoidal salmonella encephalopathy. *Neurology* 2002; 58: 1641-5.
- 40) Shiobara M, Miyazaki M, Ito H, Togawa A, Nakajima N, Nomura F, Morinaga N, Noda M. Enhanced polyadenosine diphosphate-ribosylation in cirrhotic liver and carcinoma tissues in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 338-44.
- 41) Nomura F, Yaguchi M, Itoga S, Noda M. Effects of chronic alcohol consumption on hepatic poly-ADP-ribosylation in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 35S-38S.
- 42) Iwamaru Y, Miyake M, Arii J, Tanabe Y, Noda M. An inhibitory factor for cell-free protein synthesis from *Salmonella enteritidis* exhibits cytopathic activity against Chinese hamster ovary cells. *Microb Pathog* 2001; 31: 283-93.
- 43) Arii J, Tanabe Y, Miyake M, Noda M, Takahashi Y, Hishiki H, Kohno Y. Acute encephalopathy associated with nontyphoidal salmonellosis. *J Child Neurol* 2001; 16: 539-40.
- 44) Mori M, Kuwabara S, Miyake M, Noda M, Kuroki H, Kanno H, Ogawara K, Hattori T. *Haemophilus influenzae* infection and Guillain-Barre syndrome. *Brain* 2000; 123: 2171-8.
- 45) Nomura F, Yaguchi M, Togawa A, Miyazaki M, Isobe K, Miyake M, Noda M, Nakai T. Enhancement of poly-adenosine diphosphate-ribosylation in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 529-35.
- 46) Mori M, Kuwabara S, Miyake M, Dezawa M, Adachi-Usami E, Kuroki H, Noda M, Hattori T. *Haemophilus influenzae* has a GM1 ganglioside-like structure and elicits Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 1999; 52: 1282-4.
- 47) Nomura F, Miyake M, Noda M, Itoga S, Nakai T. Long-term alcohol effects on hepatic phosphoglucomutase activities in relation to posttranslational modification of the protein. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 121S-124S.
- 48) Kuwabara S, Yuki N, Koga M, Hattori T, Matsuura D, Miyake M, Noda M. IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1998; 44: 202-8.
- 49) Suzuki K, Iwasa H, Kikuchi S, Sato T, Miyake M, Morinaga N, Noda M. The contribution of endogenous mono-ADP-ribosylation to kindling-induced epileptogenesis. *Brain Res* 1997; 745: 109-13.
- 50) Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M, Imaoka K, Yamamoto M, Fujihashi K, Ginkel FW, Noda M, Takeda Y, McGhee JR. A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5267-72.
- 51) Yamaoka J, Yamasaki S, Kurazono H, Imamura S, Noda M, Miyake M, Takeda Y. Loss of biological activity due to Glu → Arg mutation at residue 11 of the B subunit of cholera toxin. *Microbial Pathogenesis* 1997; 23: 297-302.
- 52) Nomura F, Takashima H, Itoga S, Isobe K, Takekoshi K, Noda M, Nakai T. Serum NAD glycohydrolase activities in normal subjects and in patients with chronic liver diseases. *Clinica Chimica Acta* 1997; 264: 233-8.
- 53) Nomura F, Noda M, Miyake M, Nakai T. Long-term alcohol intake enhances ADP-ribosylation of the multifunctional enzyme, phosphoglucomutase

- in rat liver. *Hepatology* 1996; 24: 1246-9.
- 54) Iwase H, Suzuki K, Kikuchi S, Morinaga N, Hasegawa S, Sato T, Noda M. Modulation of endogenous ADP-ribosylation in the kindling model of epilepsy. *Jpn J Psychiatry Neurol* 1994; 48: 287-92.
 - 55) Morinaga N, Kato I, Noda M. Differentiation of HL-60 cells is promoted by H-toxin of *Clostridium septicum*. *FEBS Lett* 1994; 351: 317-20.
 - 56) Nishikawa T, Yoshida A, Omura M, Sasano H, Noda M. Cholera toxin can ADP-ribosylate Gs as well as Gi in ACTH-unresponsive human adrenocortical cancer. *Endocrine J* 1994; 41: 593-7.
 - 57) Iwasa H, Suzuki K, Kikuchi S, Morinaga N, Hasegawa S, Sato T, Noda M. Modulation of endogenous ADP-ribosylation in the kindling model of epilepsy. *Jpn J Psychiatry Neurol* 1994; 48: 287-92.
 - 58) Nomura F, Noda M. Stimulation of mono-ADP ribosylation in rat liver plasma membranes after long-term alcohol intake. *Hepatology* 1993; 18: 870-3.
 - 59) Morinaga N, Kato I, Noda M. Changes in the susceptibility of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-treated HL-60 cells to staphylococcal leukocidin. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 537-41.
 - 60) Nishiya H, Kunii O, Noda M. Priming effect of pseudomonal leukocidin on chemiluminescence response of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 531-6.
 - 61) Nishikawa T, Noda M, Tamura Y, Yoshida S, Kato I. Cholera toxin directly stimulates pregnenolone generation with increasing Ca²⁺ efflux in bovine adrenocortical mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 46: 203-8.
 - 62) Seki K, Hirai A, Noda M, Tamura Y, Kato I, Yoshida S. Epoxyeicosatrienoic acid stimulates ADP-ribosylation of a 52 kDa protein in rat liver cytosol. *Biochem J* 1992; 281: 185-90.
 - 63) Morinaga N, Noda M, Kato I. Effect of *Clostridium septicum* H-toxin on the ADP-ribosylation of 38 kDa membrane protein of HL-60 cells. *Recent Adv Toxinol Res* 1992; 3: 401-8.
 - 64) Morinaga N, Kato I, Noda M. Identification of 38 kDa protein which is ADP-ribosylated in human promyelocytic leukemia cell membrane. *Medicine and Biology* 1992; 125: 259-63.
 - 65) Noda M, Kato I, Wang X, Hirayama T. ADP-ribosylation and activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by pseudomonal leukocidin. *Antibiot Chemother* 1991; 44: 59-62.
 - 66) Tsuji T, Inoue T, Miyama A, Noda M. Glutamic acid-112 of the A subunit of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is important for ADP-ribosyltransferase activity. *FEBS Lett* 1991; 291: 319-21.
 - 67) Wang X, Noda M, Kato I. Stimulatory effect of staphylococcal leukocidin on phosphoinositide metabolism in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1990; 58: 2745-9.
 - 68) Takano S, Noda M, Kato I. Activation of phospholipase A2 in rabbit erythrocyte membranes by a novel hemolytic toxin (H-toxin) of *Clostridium septicum*. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 56: 319-22.
 - 69) Noda M, Tsai SC, Adamik R, Moss J, Vaughan M. Mechanism of cholera toxin activation by a guanine nucleotide-dependent 19 kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1034: 195-9.
 - 70) Bobak DA, Bliziotis MM, Noda M, Tsai SC, Adamik R, Moss J. Mechanism of activation of cholera toxin by ADP-ribosylation factor (ARF): both low- and high-affinity interactions of ARF with guanine nucleotides promote toxin activation. *Biochemistry* 1990; 29: 855-61.
 - 71) Hirayama T, Noda M, Ito H, Takeda Y. Stimulation of phosphorylation of rat brush-border membrane proteins by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin, cholera enterotoxin and cyclic nucleotides, and its inhibition by protein kinase inhibitors, isoquinolinesulfonamides. *Microb Pathog* 1990; 8: 421-31.
 - 72) Vaughan M, Tsai SC, Noda M, Adamik R, Moss J. Participation of a guanine nucleotide-binding protein cascade in cholera toxin activation of adenylate cyclase. *J Mol Cell Cardiol* 21 Suppl 1989; 1: 97-102.
 - 73) Noda M, Tsai SC, Adamik R, Bobak DA, Moss J, Vaughan M. Activation of immobilized, biotinylated cholera toxin AI protein by a 19-kilodalton guanine nucleotide-binding protein. *Biochemistry* 1989; 28: 7936-40.
 - 74) Noda M, Kunz BC, Tsai SC, Adamik R, Murtagh JJ, Chen HC, Halpern JL, Moss J. Isolation and immunological properties of adenosine kinase. *Prep Biochem* 1989; 19: 351-61.
 - 75) Moss J, Bobak DA, Noda M, Price SR, Tsai SC et al. G proteins and signal transduction. *Toxicologic Pathol* 1989; 17: 818-9.
 - 76) Tsai SC, Noda M, Adamik R, Chang PP, Chen HC, Moss J, Vaughan M. Stimulation of cholera toxin enzymatic activities by GTP and two soluble proteins purified from bovine brain. *J Biol Chem* 1988; 263: 1768-72.
 - 77) 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: 45-50.
 - 78) Noda M, Kato I. Purification and crystallization of staphylococcal leukocidin. *Methods Enzymol* 1988; 165: 22-32.
 - 79) Tsai SC, Noda M, Adamik R, Moss J, Vaughan M.

- Enhancement of cholera toxin ADP-ribosyltransferase activities by guanyl nucleotides and a 19-kDa membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5139-42.
- 80) Noda M, Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y. Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. *Microb Pathog* 1987; 2: 339-49.
- 81) Noda M, Hirayama T, Matsuda F, Kato I. An early effect of the S component of staphylococcal leukocidin on methylation of phospholipid in various leukocytes. *Infect Immun* 1985; 50: 142-5.
- 82) Hirayama T, Noda M, Matsuda F, Nagamori M, Kato I. Binding of pseudomonas leukocidin to rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1984; 46: 631-4.
- 83) Hirayama T, Kato I, Matsuda F, Noda M. Crystallization and some properties of leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* 1983; 27: 575-88.
- 84) Noda M, Kato I, Hirayama T, Matsuda F. Mode of action of staphylococcal leukocidin: effects of the S and F components on the activities of membrane-associated enzymes of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1982; 35: 38-45.
- 85) Noda M, Kato I, Matsuda F, Hirayama T. Mode of action of staphylococcal leukocidin: relationship between binding of 125I-labeled S and F components of leukocidin to rabbit polymorphonuclear leukocytes and leukocidin activity. *Infect Immun* 1981; 34: 362-7.
- 86) Noda M, Kato I, Hirayama T, Matsuda F. Fixation and inactivation of staphylococcal leukocidin by phosphatidylcholine and ganglioside GM1 in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1980; 29: 678-84.
- 87) Noda M, Hirayama T, Kato I, Matsuda F. Crystallization and properties of staphylococcal leukocidin. *Biochim Biophys Acta* 1980; 633: 33-44.
-