

共同利用研究ハイライト

腸管出血性大腸菌感染症の治療薬開発のための
in silico 研究

尾又 一実 国立国際医療研究センター 数理疫学研究室室長

1. 流行が続く腸管出血性大腸菌感染症

本邦における腸管出血性大腸菌 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 感染報告数は、1996年の大流行以降も年間約4,000人前後で推移しており(図1(a))^[1]、有効な薬剤がいまだ開発されていないことを考えると、この傾向が今後も続くという可能性は大きい。EHEC感染症は症状に大きな幅があり、全く症状がないもの、軽い腹痛や下痢のみで終わるものから、およそ3~8日の潜伏期において頻回の水様便、激しい腹痛、著しい血便、さらにはこれら有症者の6~7%が、溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症などの重篤な合併症を起こし、ときには死に至るものまである^[2]。

EHEC感染症が認知されたのは、1982年、アメリカ・オレゴン州とミシガン州でハンバーガーによる集団食中毒事件があり、患者の糞便からO157が原因菌として見つかったのが最初で^[1,2,3]、それ以前はその存在が知られていなかった。本邦では、1984年に大阪府で、2才と5才の兄弟が腹痛と水様性下痢を

発症し、血性下痢になったのが最初の報告であろう。当時はまだEHECの認知度が低かったので、詳しい検査は実施されず、原因不明の下痢症として処理されたが、翌年、保存されていた弟の糞便からO157が検出された^[3]。

2. 志賀毒素とその阻害分子

EHEC感染症の病原分子は、EHECが産生する志賀毒素(ヴェロ毒素ともいう)である。EHECの血清型は、菌の表面にあるO抗原(細胞壁由来)とH抗原(べん毛由来)により細かく分類されており^[2]、代表的な血清型にO157:H7がある(図1(b))。EHECは、血清型によって、志賀毒素を産生するものとしめないものがある。

志賀毒素(Stx)は、Aサブユニット(StxA)とBサブユニット(StxB)からなる。StxBは標的細胞膜上の中性糖脂質であるグロボトリアオシルセラミド(Gb3)の糖鎖部を特異的に認識し、これによりStxはエンドサイトーシスで細胞内に侵入する。StxAは侵入後の細胞内での毒素活性を担う^[4]。本研究

で着目するStxBは5量体タンパク質である(図2a)。Stxには2種類のファミリー、Stx1、Stx2があり、StxBの残基数は1量体あたりそれぞれ69個と70個、合計で345個と350個である。StxBの形状は平面的で、明らかな結合ポケットを持たない。結合サイトは1量体あたり3箇所あることが知られており^[4,5]、合計15個が、表面上に分布している(図2a)。

西川喜代孝の研究グループは、これまでに多くのStxB阻害分子を考案してきたが^[4,6,7]、最近、ペプチド・ライブラリー法を利用して、Stx1B、Stx2B双方に強く結合するリガンド、MMAtetを開発した^[7]。このリガンドは、彼らが長年研究を続けている、“腕”のある(多価の)ペプチド・オリゴマーの一つで、腕(ライブラリー部分)の数は4本、各腕のアミノ酸配列(モチーフ)は、MAMMARRRRRAである(図2b)。この大きさは、StxBの表面をほぼ覆う大きさである。

StxBは、単独^[8]もしくはGb3やその他の分子との複合体^[5,9,10,11]はX線解

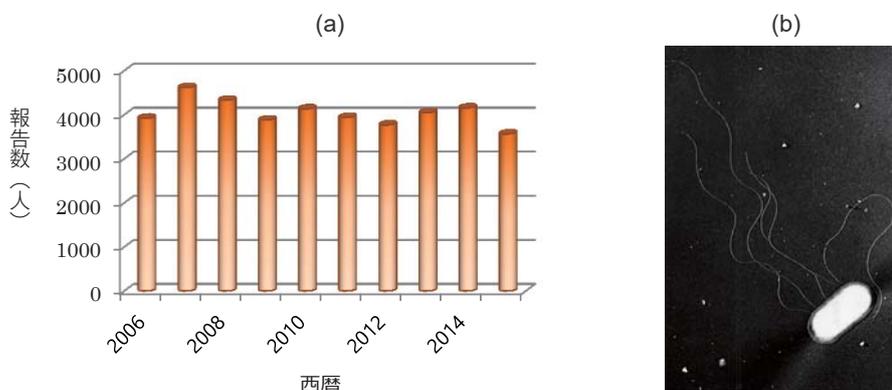


図1 (a)国内の2006-2015の期間の腸管出血性大腸菌感染症報告数。(b)腸管出血性大腸菌O157:H7の電子顕微鏡写真(国立感染症研究所 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/ehec-m/2055-bac1/related/710-ehec-o157sem.html>)。

析によって結晶構造が明らかにされているが、西川らのペプチド性阻害薬との複合体は現在のところ結晶化に成功していないため、その静的な構造さえ不明である。そこで、本研究では、分子動力学 (MD) シミュレーションの方法により、Stx1のBサブユニット (Stx1B) とMMAtetの結合を詳しく検討することにした。

3. In silico研究の方法

MDシミュレーションは、高速計算プログラムGeneralized-Ensemble Molecular Biophysics (GEMB、奥村久士准教授 (分子研) による開発)^[12]を使って行った。このプログラムは、腕を持つ樹状分子を扱うことができる。Stx1Bの初期構造は、PDBコード1BOSを用いた。水分子は約2万個が必要と見積もられ、力場は、StxBとMMAtetにはAMBER99SBを、水分子にはTIP3Pを用いた。

4. 計算結果

MMAtetのライブラリー部分1本単独をStx1Bに結合させた場合、Stx1Bの結合サイトにある酸性アミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸) に、リガンドの塩基性アミノ酸 (アルギニン) が引き寄せられるように結合した。単独のライブラリー部分4本をStx1Bに結合させた場合は、一つの例として、2本のペプチドはStx1Bの表側に結合したが、他の2本は裏側と側面に結合する、といった結果が得られた。ただし、Stx1Bの裏側にはStx1Aがあるので、裏側への結合ということは現実にはあり得ない。この計算結果は、4本は同じものであるから同じ電荷をもって、相互に斥力が働いたことを示していると考えられる。このことは、西川らの生物学実験で、ライブラリー単

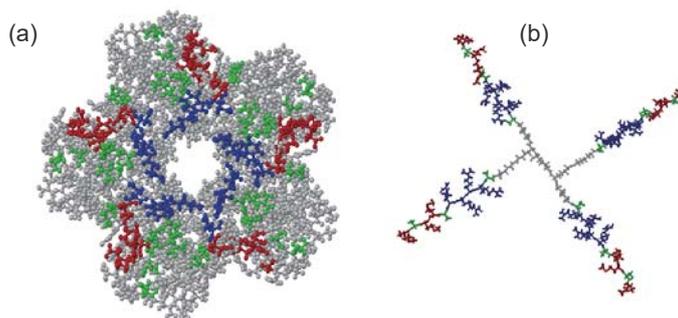


図2 (a) Stx1B と (b) MMAtet の構造。Stx1B の3種類の結合サイトの原子を赤、緑、青で示す。MMAtet は、M (メチオニン)、A (アラニン)、R (アルギニン) の原子をそれぞれ赤、緑、青で示す。

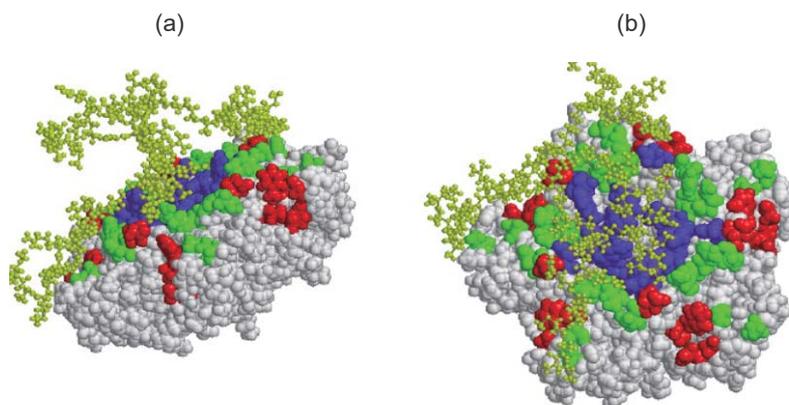


図3 時間 10ns(a)、150ns(b)における、Stx1B-MMAtet 複合体の構造。Stx1B、MMA-tet はそれぞれ、space-fill、黄色の ball-and-stick で示した。赤、青、緑は Stx1B の3種類の結合サイトを表す。

量体の場合は、StxBの結合サイトに対する結合モチーフがまったく得られなかったという事実^[4]と符合している。

ペプチド・ライブラリー4本を結合して4量体を作り (MMAtet)、Stx1Bに結合させた場合、各ライブラリー部分は、上記の場合のように分散することなく、Stx1Bの表側に結合した (図3)。Stx2BについてもMDシミュレーションを行った結果、同様の結合が見られた。Stx1B-MMAtet 複合体のスナップショットを図3に示す。時間10nsで (図3a)、十分結合していなかったリガンドの一部は、150nsでは (図3b)、Stx1との距離がかなり小さくなった。

Stx1BとMMAtetの結合を定量的に検討するために、MMAtetのアミノ酸残基 i と Stx1Bのアミノ酸残基 k の重心間の距離 d_{ik} を計算し、結合スコア S_{ik}

を $S_{ik}=1/d_{ik}$ と定義した。図4aに、結合スコアの等高線のスナップショットを示す。腕の一つArm1はStx1B全体に広がって結合しているが、他の腕はStx1B上の偏った領域に結合していることがわかる。たとえば、Arm4は、Stx1Bの5量体の内、図の下部のバーの一番左に示した単量体との結合スコアが高い。

Stx1Bの5量体の各単量体、およびMMAtetの各腕は、同じアミノ酸配列なので、双方について結合スコアの和をとって集約すると、図4bのような等高線が得られる。スコアの高い領域が、3~4か所あるのがわかり、これらはいずれも縦帯状になっていて、MMAtetが、Stx1Bの限られたアミノ酸残基に選択的に結合していることを示している。この選択性は、他のサンプルにつ

いても見られ、かつ、選択部分はほぼ同じであった。

どのアミノ酸が強く結合しているかを見るために、スコアの高い結合について検討した。Arm1では、Stx1BのW34、N35、D18、がスコアの高いアミノ酸で、Arm2-4では、N55、H58、G61、G62、が多く見られた。西川らの最近のミュレーション実験では、D17、D18、F30、W34、G62、が着目され、これらをグルタミン酸、アラニンなどに置換すると、結合度が著しく低下することが示されている^[7]。したがって、本研究の結果は、実験結果との良好な一致を示していると考え

ことができ、現実のStxB-MMAtet結合を反映しているであろうと推論される。また、ミュレーション実験で着目されていないアミノ酸が、シミュレーションでは結合に寄与していると思えることがあるが(N55、H58など)、以前の研究で^[6]、簡単なMDシミュレーションにより、StxBのいくつかの残基

がリガンドの結合に寄与していることが示唆され、生物学実験に採用された。これらのことから、本研究のMDシミュレーションは、EHEC感染症に関する生物学実験および薬剤の開発において、重要な役割を担っているといえる。

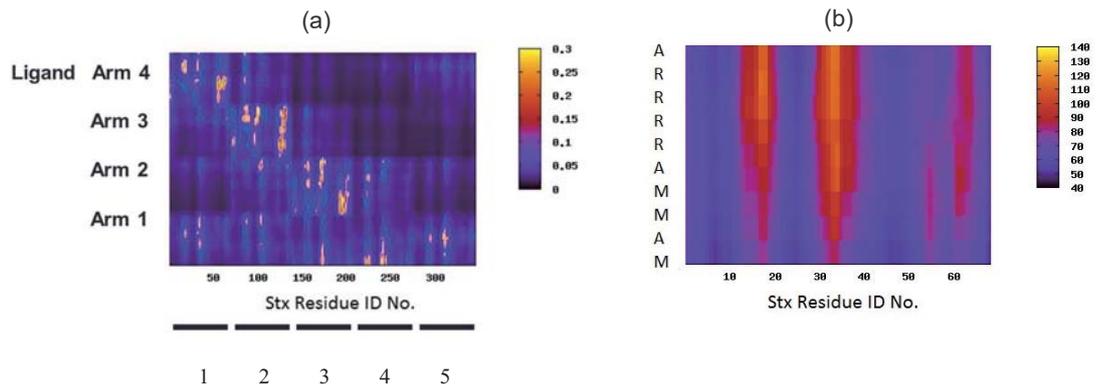


図4 (a) 結合スコア S_{ik} の等高線のスナップショット。縦軸はMMAtet (リガンド) の各腕の識別番号、横軸は志賀毒素のアミノ酸残基 k の識別番号で、下のバーは5量体の各単量体を示す。MMAtetのアミノ酸配列は、各腕について下からMAMMARRRRA。(b) Stx1Bの5量体の各単量体およびMMAtetの各腕について和をとった結合スコアの等高線。時間140-150ns。縦軸はMMAtetのアミノ酸配列、横軸はStx1Bのアミノ酸残基の識別番号で、各単量体のアミノ酸識別番号は、1番目の単量体の番号1~69に集約した。

参考文献

- [1] 国立感染症研究所, *IASR* **37**, 85-86 (2016).
- [2] 厚生労働省, http://www1.mhlw.go.jp/o-157/o157q_a.
- [3] 大阪府立公衆衛生研究所, *公衛研ニュース No.1* (1997).
- [4] 西川喜代孝, 志賀毒素の細胞内輸送を誘導するペプチド, *蛋白質 核酸 酵素* **53**, 44-51 (2008).
- [5] H. Ling et al., Structure of the Shiga-like Toxin I B-Pentamer Complexed with an Analogue of Its Receptor Gb3. *Biochemistry* **37**, 1777-88 (1998).
- [6] K. Nishikawa, M. Watanabe, E. Kita, K. Igai, K. Omata, M.B. Yaffe, and Y. Natori, A multivalent peptide library approach identifies a novel Shiga toxin inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin, *The FASEB Journal*, **20**: 2597-9, 2006.
- [7] K. Tsutsuki, M. Watanabe-Takahashi, Y. Takenaka, E. Kita, and K. Nishikawa, Identification of a Peptide-Based Neutralizer That Potently Inhibits Both Shiga Toxins 1 and 2 by Targeting Specific Receptor-Binding Regions, *Infect. Immun.* **81**, 2133-2138 (2013).
- [8] M.E. Fraser et al., Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7, *J. Biol. Chem.* **279**, 27511-27517 (2004).
- [9] P.I. Kitov et al., Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands, *Nature* **403**, 669-672 (2000).
- [10] J.M. Jacobson et al., The crystal structure of Shiga toxin type 2 with bound disaccharide guides the design of a heterobifunctional toxin inhibitor, *The J. Biol. Chem.* **289**, 885-894 (2014).
- [11] M.E. Fraser et al., Binding of adenine to Stx2, the protein toxin from *Escherichia coli* O157:H7, *Acta Cryst.* **F62**, 627-630 (2006).
- [12] H. Okumura, Temperature and pressure denaturation of chignolin: Folding and unfolding simulation by multibaric-multithermal molecular dynamics method, *Proteins*, **80**: 2397-2416, 2012.



おまた・かずみ
 1988年慶應義塾大学工学部物理学科卒、
 1999年同大学院博士課程修了、同大学助手。
 この間、東京工業大学、日本IBMに在籍。
 2001年より現職、
 2002~2004年コペンハーゲン大学エルステッド
 研究所研究員。
 専門：計算医学。
 趣味：ゴルフ、禅の文化の探求、動植物の飼育、音楽。