

201033057A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安心・安全確保推進研究事業

腸管出血性大腸菌汚染食品中の毒素プロファイリングに即応した実践的  
集団感染制圧システムの構築

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 美帆

平成 23 (2011) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
腸管出血性大腸菌汚染食品中の毒素プロファイリングに即応した実践的集団 感染制圧システムの構築	
高橋 美帆	----- 2
II. 分担研究報告	
1. 臨床および環境分離 STEC 株の分離同定に関する研究	
山崎 伸二	----- 8
2. 各Stx群に対する特異的制御分子の開発	
内藤 幹彦	----- 11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 16

腸管出血性大腸菌汚染食品中の毒素プロファイリングに即応  
した実践的集団感染制圧システムの構築

研究代表者 高橋 美帆 同志社大学生命医科学部医生命システム学科 助教

研究要旨

大腸菌 O157:H7 に代表される腸管出血性大腸菌(STEC)による感染は、下痢や出血性大腸炎ばかりでなく、時に溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症等の重篤な合併症を併発する。Shiga toxin (Stx)は STEC が産生する主要な病原因子である。我々はこれまでに Stx の細胞内輸送を阻害することで Stx の毒性を抑制する新規ペプチド性 Stx 阻害薬を開発し、Stx の細胞内輸送制御が本感染症治療に直結するという全く新しい概念を見出した。本研究では本概念に立脚し、1) 家畜牛、流通食品、臨床現場から STEC 株を単離し、産生されるすべての Stx ファミリーならびにバリエーションを同定すること、2) 各 Stx の細胞内輸送を阻害し、Stx の毒性を抑制する一連のペプチド性 Stx 阻害薬を同定すること、3) 各 STEC 株の産生毒素プロファイリングに応じ、最も有効な阻害薬の組み合わせを同定し、感染実験における効果を評価すること、を目的とした。本年度は、1)家畜牛糞便、市販牛肉、患者から STEC を単離し、その血清型を同定した。また、2) 1)の臨床分離株から得られた Stx のうち Stx2d(vha)ならびに Stx2d(act) (Stx2vha(act))について、野生型 B サブユニットと Stx2d 受容体結合部位に変異を有する変異型 B サブユニットを作成した。現在、我々が独自に開発した多価型ペプチドライブラリー法を用いて、Stx2d 受容体結合部位特異的モチーフの同定を行っている。

分担研究者

山崎伸二 大阪府立大学大学院  
生命環境科学研究科 教授  
内藤幹彦 国立医薬品食品衛生研究所  
機能生化学部 教授

研究協力者

日根野谷淳 大阪府立大学大学院  
生命環境科学研究科 助教

A. 研究目的

大腸菌 O157:H7 に代表される腸管出血性大腸菌(STEC)による感染は、下痢や出血性大腸炎ばかりでなく、時に溶血性尿毒症症候群 (HUS)や脳症等の重篤な合併症を併発する。2004年にアメリカの食肉牛の STEC 保有菌は50%

を超え、日本でも 2006-2007 年に愛媛県で行われた牛の STEC 保菌状況調査では、143 頭中 82 頭が陽性であり、他県でもここ数年で急速な広がりを見せている。このことは、常に大規模集団感染の危険にさらされていることを示しており、我が国の食品安全に対する大きな懸念となっている。

Shiga toxin (Stx)は STEC が産生する主要な病原因子であり、血中に侵入した Stx が腎臓や脳などの標的臓器を障害し、上記合併症を引き起こす。Stx は Stx1, Stx2 の 2 つのファミリーから構成され、Stx2 の方が临床上、症状の重篤化と深く関係すると言われている。Stx の構造は毒性本体の A サブユニット 1 分子と、標的細胞との結合を担う B サブユニット 5 量体からなる。Stx B サブユニット 5 量体は標的細胞膜上に存在する糖脂質 Gb3 (gal-gal-glc-ceramide) を受容体とし、Gb3 のグロボ 3 糖部を特異的に認識する。Stx B サブユニット 1 分子にはサイト 1-3 の 3 種類のグロボ 3 糖結合部位が存在する。従って Stx B サブユニット 5 量体には最大 15 分子のグロボ 3 糖が結合し、結合親和性が著しく亢進する。この現象をクラスター効果と呼ぶ。Stx が Gb3 に結合すると、Stx はエンドサイトーシスにより細胞内に取りこまれ、小胞輸送によってゴルジ体、小胞体へと運ばれる。その後、

A サブユニットが細胞質に移行し毒性を発揮する。この輸送経路は分泌タンパク質の順行輸送とは逆方向であることから、逆行輸送とよばれており、Stx の毒性発現に必須である。

我々はこれまでに、それ自体がクラスター効果を発揮する多価型ペプチドライブラリーを開発し、临床上重篤化と関係の深い Stx2 のグロボ 3 糖結合部位の 1 つであるサイト 3 を標的とした世界初のペプチド性 Stx 阻害薬 (PPP-tet) を開発した (PCT/JP2005/012286, FASEB J., 2006)。興味深いことに、PPP-tet は Stx2 の標的細胞への結合を阻害せず、その細胞内輸送、特にゴルジ体から小胞体への逆行輸送を特異的に阻害する。さらに、マウスを用いた STEC 感染実験において経口投与で非常に高い治癒効果を示した。このことは、Stx の細胞内輸送の制御が本疾患の治療に極めて有効であることを意味している。一方、STEC が産生する Stx にはさまざまなバリエーションが存在しており、臨床分離株によっては、複数の異なったタイプの Stx を産生し、このことが症状の重篤化に関係していることが明らかになりつつある。しかしながら、その詳細についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、1)流通食品や牧畜牛などの環境、ならびに臨床現場からさまざまな STEC 株

を単離し、その全てのタイプの Stx を同定すること、2) 得られた Stx1, Stx2 さらに各々のバリエーション (Stx1c, Stx2c, Stx2d(vha), Stx2d(act) (Stx2vha(act)), Stx2e, Stx2f) について、多価型ペプチドライブラリー法を用いて、その細胞内輸送を制御することで毒素を阻害する一連の化合物を同定すること、さらに STEC 株の産生毒素プロファイリングに対応した阻害化合物の組み合わせを決定し、個々の STEC 感染症に対する新たな治療法を確立することを目的とする。

## B. 研究方法

### テーマ 1) 臨床および環境分離 STEC 株の分離同定

ウシ糞便、市販牛肉、患者検体から STEC 株を単離し、PCR 法およびマルチプレックス PCR 法で *stx* 遺伝子をスクリーニングする。次に *stx1/stx2* 遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法により *stx* 陽性菌を単離し、PCR-RFLP 法により *stx* 遺伝子の型別を決定する。

テーマ 2) 各 Stx 群の細胞内輸送ステージ特異的制御分子の開発  
—多価型ペプチドライブラリー法を用いた各受容体結合サイト特異

### 的なペプチド性阻害薬の同定—

標的とする StxB サブユニットの HUS 患者検体から単離した STEC 株のうち、Stx2d, Stx2d (act) 産生が確認されている株を用いて、B サブユニットを発現ベクターにクローニングし、精製を行う。得られた B サブユニットの受容体結合能は ELISA および Biacore を用いて検討する。また同様に、StxB サブユニットのサイト 1 あるいはサイト 3 に特異的に変異を導入した変異 B サブユニットを作成する。得られた B サブユニットおよび各種変異 B サブユニットを用いて、多価型ペプチドライブラリー法によるスクリーニングを行う。多価型ペプチドライブラリーは図 1 に示す構造をもつ。リジン残基が 3 つ結合した構造を核構造とし、末端のアミノ基に 4 つのペプチドが結合した 4 価ペプチドとなっている。X にはシステイン以外の 19 種類のアミノ酸がランダムに配置する。スクリーニングの方法は、野生型 B サブユニットおよび変異 B サブユニットに本ライブラリーを結合させ両者から得られた結合画分を、アミノ酸シーケンスを行い、得られたモチーフをサブトラクションすることで、最終的に各 X の位置で最も強く選択されたアミノ酸を決定する。

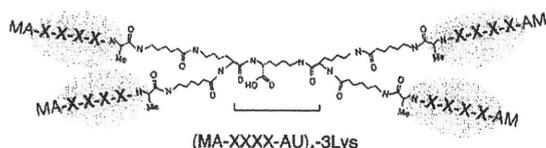


図1 多価型ペプチドライブラリー

(倫理面への配慮)

本研究は、研究代表者ならびに研究分担者の所属する大学・研究所における組換え DNA 実験に際しては、各大学・研究所の組換え DNA 実験安全管理委員会規定にのっとり、安全に十分配慮して実験を行う。研究代表者が行う Stx1, 各種 Stx2 変異体の調製については、遺伝子組換え生物などの第二種使用などをする間に執る拡散防止措置の確認を行い、文部科学大臣確認の上、実験を行った。

### C. 研究結果

#### テーマ1) 臨床および環境分離STEC株の分離同定

ウシから単離された STEC 株の血清型は、022:H8、0130:H24、017:H11、0153:H25 であり、*stx* 遺伝子は、022:H8 と 0153:H25 は *stx1* と *stx2* の両陽性、0130:H24 と 017:H21 は *stx2* 単独陽性であった。食肉由来の STEC からは *stx1* 単独陽性株、*stx2* 単独陽性株、

*stx1/stx2* 両陽性株が検出された。患者由来の STEC からは、0157:H7、0157:H- 026:H-, 026:H11, 0145:H-が検出され、*stx* 遺伝子は *stx1/stx2* 両陽性株、*stx1/stx2d* 両陽性株、*stx1* 単独陽性株、*stx2* 単独陽性株、*stx2d* 単独陽性株が検出された。

テーマ 2) 各 Stx 群の細胞内輸送ステージ特異的制御分子の開発  
～多価型ペプチドライブラリー法を用いた各受容体結合サイト特異的なペプチド性阻害薬の同定～

臨床分離株由来の Stx2dB サブユニット遺伝子を pET28b 発現ベクターにクローニングし、ヒスチジンタグ Stx2d B サブユニット (2dBH) を作成した。得られた 2dBH について、Stx 受容体 Gb3 (globotriosylceramide) への結合能を ELISA により検討し、2dBH が Gb3 結合活性を有することを確認した。次に、Stx2 の受容体結合サイトの、サイト 1 およびサイト 3 に各々特異的に変異を導入した変異 B サブユニットを作成した。得られた野生株 Stx2d、変異型 Stx2dBH を用いて、現在多価型ペプチドライブラリーによるスクリーニングが進行中である。

### D. 考察

本年度、臨床ならびに環境中から得られた *stx* 遺伝子は、ほとんどが *stx2* 単独陽性株、両陽性株であり、患者からは *stx2d* 陽性株が得られた。この結果は、これらのなかには *Stx2* バリエントが複数種類含まれている可能性を示唆しており、現在、すべての株の *Stx* の塩基配列を解析中である。今後、継続して家畜牛、流通食品および患者からの STEC 単離、*Stx* 産生プロファイリングを進め、集団感染発症に柔軟に対応できる体制を確立する。

テーマ 2)では、多価型ペプチドライブラリー法を用いて現在、*Stx2d* B サブユニットの受容体結合サイト特異的なモチーフ解析を行っている。今後、さまざまな *Stx* バリエントの受容体結合サイトに結合するモチーフを取得するにあたり、多価型ペプチドライブラリー法のみでは、バリエント間の微細な構造の相違を認識する特異性の高い阻害ペプチドを取得するのが困難な場合も想定される。この問題を解決するために、我々が新たに開発した多価型ペプチドシート合成技術（特願 2010-019731）を用いる。本技術は、intavis AG 社のスポットペプチドシンセサイザーを用い、セルロースシート上に一度に 384 種類の既知配列ペプチドをスポット合成するが、ここでシート上に 2 価あるいは 4 価の核構造を合成することで、シート上の各々

ペプチドにクラスター効果を付与させている。このシートを野生型ならびに各変異 B サブユニットでプロットし、結合性を比較して、サイト特異的なモチーフを決定する。本技術と多価型ペプチドライブラリー法を組み合わせることによって、特異的な阻害ペプチドを同定できるものと期待される。

## E. 結論

本年度は、家畜牛糞便、市販牛肉、臨床から STEC を単離した。ウシ由来の単離 STEC の血清型は、全て non-O157:H7、患者由来の単離 STEC からは O157:H7 株が検出された。また牛糞便、市販牛肉、患者検体から検出された *stx* 遺伝子は *stx2* 単独陽性株、*stx1/stx2* 両陽性株がほとんどを占めた。

臨床分離株由来の STEC 株のうち、*Stx2d*, *Stx2d(act)* の B サブユニットの精製、性状解析を行った。また B サブユニットの受容体結合部位変異体を複数種類作成し、野生型ならびに変異型 B サブユニットを用いて現在多価型ペプチドライブラリー法によるスクリーニングを検討中である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

1) Watanabe-Takahashi M, Sato T, Dohi T, Noguchi N, Kano F, Murata M, Hamabata T, Natori Y, and Nishikawa K. An orally applicable Shiga toxin-neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin. **Infect. Immun.**, 2010, 78, 1, pp177-83.

### 2.学会発表

1) 高橋美帆；新規ペプチド性 Shiga toxin 阻害薬の生体内作用機構の解明. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 29 日、横浜

2) 高橋美帆；新規ペプチド性 Shiga toxin 阻害薬と Stx との結合分子機構の解析. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡

2011-017295、発明者；西川喜代孝、高橋美帆、西村浩輝、高柳広、尾藤晴彦、共同出願人；学校法人同志社、国立大学法人東京医科歯科大学、出願日；2011 年 1 月 28 日

2) 発明の名称；ペプチドのスクリーニング方法、特許出願番号；特願 2010-019731、発明者；西川喜代孝、高橋美帆、加藤美帆子、出願人；学校法人同志社、出願日；2010 年 1 月 29 日

3)発明の名称；Stx 毒性阻害ペプチドおよび Stx に起因する疾患の治療薬、特許出願番号；特願 2010-019728、発明者；西川喜代孝、高橋美帆、津々木一恵、出願人；学校法人同志社、提出日 2010 年 1 月 29 日（基礎となる出願；特願 2009-212480）

## H.知的財産権の出願・登録状況

### 1.特許取得

なし

### 2.実用新案登録

なし

### 3.その他

1) 発明の名称；CaMKII 阻害ペプチドおよびこれを含む CaMKII 阻害剤、特許出願番号；特願

## 臨床および環境分離 STEC 株の分離同定に関する研究

分担研究者 山崎伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 教授  
研究協力者 日根野谷 淳 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 助教

### 研究要旨

家畜、食肉及びヒトから分離した STEC の毒素型及び細菌学的性状を解析した。健康なウシ由来の STEC 171 株中、*stx1* 陽性株が 2 株、*stx2* 陽性株が 101 株、*stx1* と *stx2* 両陽性が 67 株であった。一方、我が国の市販食肉 18 検体から、8 株の STEC (1:*stx1*、3:*stx2*、4:*stx1/stx2*) を単離した。ヒトから分離した STEC 90 株の毒素型は、0157 67 株 (38:*stx1/stx2*、21:*stx2*、7:*stx2vha*、1:*stx1/stx2vha*)、0157:H- 6 株 (*stx1/stx2vha*)、026:H11 10 株 (*stx1*)、026:H- 5 株 (*stx1*)、091 1 株 (*stx1*)、0145:H- 1 株 (*stx2*) であった。

### A. 研究目的

0157:H7 に代表される腸管出血性大腸菌 (EHEC) あるいは志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は、志賀毒素/Vero 毒素 (Stx/VT) を産生することにより出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群等の生死に関わる病態を引き起こす。Stx は、免疫学的に異なる Stx1 と Stx2 に分類される。また、それぞれの Stx にはいくつかのバリエーションが報告されている。本研究では、家畜、食肉及び患者から STEC を分離し、分離された STEC の毒素型別及び細菌学的性状を解析することを目的とした。

### B. 研究方法

菌株：健康なウシの便から分離した STEC 171 株及びヒトから分離された STEC 90 株を本実験に供した。STEC 0157:H7 堺株 (Stx1/Stx2)、STEC 091:H21 (Stx2vha/Stx2vhb)、STEC 0139 (Stx2e)、STEC 0157:H- (Stx2c) 及び *E. coli* C600 株をそれぞれ陽性及び陰性コントロールとして用いた。培養及び *stx* 遺伝子の検出：便検体からの STEC の分離は TSB あるいは SMAC を用いて培養後、食肉検体は、TSB または mEC で増菌培養後、PCR 法で *stx*

遺伝子の有無を確認した。*Stx* 遺伝子のスクリーニングは、*stx1/stx2*を検出できる共通プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法で行った (Pal A *et al.*, Indian J. Med. Res., 110: 83-85, 1999)。

**菌株の単離及び同定：**PCR で陽性となった検体を L-agar に植菌し、<sup>32</sup>P で標識した *stx1/stx2* 遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法で *stx* 陽性菌を分離した。分離菌が大腸菌であることを生化学的性状試験で確認した。

**Stx 遺伝子の型別：***Stx* 遺伝子の型別は、Beutin ら (Appl. Environ. Microbiol., 73:4769-4775, 2007) が報告した PCR-RFLP 法によって行った。

(論理面への配慮)

該当無し。

### C. 研究結果

1) 家畜由来の STEC : ウシ由来の STEC 171 株の血清型及び志賀毒素の型別を行った。その結果、O22:H8 が 43 株、O130:H24 が 30 株、O17:H11 が 24 株、O153:H25 が 24 株であった。志賀毒素型は、O22:H8 と O153:H25 は *stx1* と *stx2* の両陽性であり、O130:H24 と O17:H21 は *stx2* 単独陽性であった。その他の血清型は、*stx1/stx2* 両陽性が

1 株、*stx1* 単独陽性が 2 株であった。

2) 食肉由来の STEC : 食肉から分離した 8 株の STEC のうち 1 株が *stx1* 単独陽性、3 株が *stx2* 単独陽性、4 株が *stx1/stx2* 両陽性であった。

3) ヒト由来の STEC : ヒト由来の STEC 90 株のうち、*stx1/stx2* 両陽性が 38 株 (O157:H7)、*stx1/stx2vha* が 7 株 (1 株 O157:H7、6 株 O157:H-)、*stx1* 単独陽性が 16 株 (10 株 O26:H11、5 株 O26:H-、1 株 O91)、*stx2* 単独陽性が 22 株 (21 株 O157:H7、1 株 O145:H-)、*stx2vha* 単独陽性が O157:H7 の 7 株であった。

### D. 考察

ウシ、食肉や患者から分離された STEC は、そのほとんどが *stx1/stx2* あるいは *stx2* 陽性菌であり、*stx1* 単独陽性株は非常にまれであった。また、ヒト由来株では、一部 *stx2vha* を保有する STEC も存在した。

### E. 結論

我が国で分離された STEC が保有する *stx* 遺伝子は、血清型とは関係なくそのほとんどが *stx1* あるいは *stx2* であり、O157 の一部の株で *stx2vha* が存在することがわかった。

### G. 研究発表

## 1. 論文発表

(1) Y. Wu, A. Hinenoya, T. Taguchi, A. Nagita, K. Shima, T. Tsukamoto, N. Sugimoto, M. Asakura, and S. Yamasaki. 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.**, 72: 589-597, 2010.

## 2. 学会発表

(1) 日根野谷 淳、呉 育羅、田口 堯、朝倉昌博、杉本典彦、山崎伸二：ヒト及びウシから分離した志賀毒素産生性大腸菌における病原因子の保有状況の解析 第14回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2010年7月、宮崎

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当無し

### 2. 実用新案登録

該当無し

### 3. その他

該当無し

## 各Stx群に対する特異的制御分子の開発

分担研究者 内藤 幹彦 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部 部長

### 研究要旨

本研究では、臨床および環境由来 STEC 株から産生された各 Stx の毒性を阻害する一連のペプチド性 Stx 阻害薬について、Stx 結合活性、Stx 結合特異性、標的細胞に対する Stx 毒性阻害活性等々を評価すること、Stx の細胞内輸送を制御することで Stx の毒性を阻害するタイプの阻害薬の場合には、Stx の細胞内輸送における Stx 阻害薬の影響を詳細に検討し、各オルガネラでの情報伝達機構、各種ストレス応答等への影響の観点から Stx 阻害メカニズムを解明することを目的とする。

本年度は、臨床および環境中から単離された STEC 株から産生される Stx 群の、精製および性状解析を行った。HUS 患者検体から単離した STEC 株のうち、Stx2d, 2d(act)産生が確認されている株を用い、Stx2d B サブユニットと B サブユニットの受容体結合部位に変異を導入した変異 B サブユニットを複数種類作成した。今後も、引き続きその他のリコンビナント Stx B サブユニットを作成する。また多価型ペプチドライブラリー法により各 Stx B サブユニット受容体結合サイト特異的阻害ペプチドが同定され次第、Stx の細胞内輸送における各阻害薬の影響を詳細に検討する。

### A. 研究目的

本研究は、家畜牛、流通食品、患者から単離された STEC 株から産生される各 Stx 群（Stx1 とそのバリエーション Stx1c, Stx2 とそのバリエーション Stx2c, Stx2d, Stx2d(act), Stx2e, Stx2f）すべてについて、Stx の発現、

精製、受容体結合能、vero 細胞、Hela 細胞に対する毒性、などの性状解析を行い、各 Stx 群の受容体結合サイトの同定、毒性発現メカニズムならびに細胞内輸送機構の検討を行うことを目的とする。本年度は、HUS 患者検体から単離した STEC 株のうち、Stx2d, 2d(act)産生が確認されている株を用

い、BサブユニットとBサブユニット受容体結合部位に特異的に変異を導入した変異型Bサブユニット(N16A, W29A)を精製し、性状解析を行った。

## B. 研究方法

pET28b 発現ベクター、DH5 $\alpha$  および BL21/DE3 コンピータント細胞を用いて Stx2d B サブユニットをクローニングし、ヒスチジンタグ Stx2d B サブユニットを発現・精製した。精製にあたっては、ニッケルビーズによるアフィニティー精製を行った。また、Stx2d B サブユニットの受容体結合サイト1またはサイト3に1アミノ酸変異を導入した変異型Bサブユニット N16A, W29A を作成した。

得られた各々BサブユニットはELISA法およびBiacoreによりStx受容体結合活性を評価した。

## C. 研究結果

Stx2d Bサブユニットおよび変異型Bサブユニット(N16A, W29A)をそれぞれ作成した。野生型Bサブユニットと変異型Bサブユニット(N16A, W29A)はいずれも5量体を形成していること、野生型Bサブユニットは受容体であるGb3結合活性を有し、変異型Bサブユニット(N16A, W29A)

は受容体結合活性がないことが示された。

## D. 考察

本研究により作成された野生型および変異型Bサブユニットを用いて、今後、多価型ペプチドライブラリー法によりStx2d Bサブユニットのサイト特異的結合モチーフを同定する。また、その他の各々Stxについても同様にヒスチジンタグBサブユニットおよびサイト特異的に変異を導入した変異型Bサブユニットを作成し、多価型ペプチドライブラリーのスクリーニングを行う。

## E. 結論

Stx2dのサイト1, サイト3特異的結合モチーフを同定するために、Stx2d Bサブユニットおよび変異型Bサブユニット(N16A, W29A)を作成した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kim S, Ohoka N, Okuhira K, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Naito M. Modulation of RIP1 ubiquitylation and distribution by MeBS to sensitize cancer cells to tumor necrosis factor

alpha-induced apoptosis. **Cancer Sci** (2010) 101: 2425-9.

2) Itoh Y, Ishikawa M, Naito M, Hashimoto Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. **J Am Chem Soc** (2010) 132: 5820-6.

3) Okuhira K, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Ohoka N, Suzuki K, Sawada J, Naito M, Nishimaki-Mogami T. Binding of PDZ-RhoGEF to ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) induces cholesterol efflux through RhoA activation and prevention of transporter degradation. **J Biol Chem** (2010) 285: 16369-77.

## 2.学会発表

1) Okuhira, K., Ohoka, N., Nishimaki-Mogami, T., Ito, Y., Ishikawa, M., Hashimoto, Y., Naito, M. : CRABP degradation based on a protein knockdown strategy.、第 69 回日本癌学会学術総会(2010.9) (大阪)

2) 大岡 伸通, 内藤 幹彦 : Molecular analysis of regulatory mechanism of TNFalpha-inducible apoptosis increased by depletion of cIAP1 expression、第 69 回 日本癌

学会学術総会 (2010.9) (大阪)

3) 内藤幹彦: 細胞死阻害タンパク FLIP による Wnt シグナル制御機構、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010.12) (神戸)

## H.知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe-Takahashi M, Sato T, Dohi T, Noguchi N, Kano F, Murata M, Hamabata T, Natori Y, and Nishikawa K.	An orally applicable Shiga toxin-neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin.	<b>Infect. Immun.</b>	78(1)	177-83	2010
Y. Wu, Hinenoya A, Taguchi T, Nagita A, Shimada K, Tsukamoto T, Sugimoto N, Asakura M, and Yamasaki S.	Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan.	<b>J. Vet. Med. Sci.</b>	72	589-97	2010
Kim S, Ohoka N, Okuhira K, Saito K, Nishimaki-Mogami T, Naito M.	Modulation of RIP1 ubiquitylation and distribution by MeBS to sensitize cancer cells to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.	<b>Cancer Sci.</b>	101	2425-9	2010

Itoh Y, Ishikawa M, <u>Naito M</u> , Hashimoto Y.	Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins.	<b>J Am Chem Soc</b>	132	5820-6	2010
Okuhira K, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Ohoka N, Suzuki K, Sawada J, <u>Naito M</u> , Nishimaki-Mogami T.	Binding of PDZ-RhoGEF to ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) induces cholesterol efflux through RhoA activation and prevention of transporter degradation.	<b>J Biol Chem</b>	285	16369-77.	2010

## An Orally Applicable Shiga Toxin Neutralizer Functions in the Intestine To Inhibit the Intracellular Transport of the Toxin<sup>∇</sup>

Miho Watanabe-Takahashi,<sup>1</sup> Toshio Sato,<sup>2</sup> Taeko Dohi,<sup>3</sup> Noriko Noguchi,<sup>4</sup> Fumi Kano,<sup>5,6</sup>  
Masayuki Murata,<sup>5</sup> Takashi Hamabata,<sup>2</sup> Yasuhiro Natori,<sup>7</sup> and Kiyotaka Nishikawa<sup>1\*</sup>

Department of Molecular Life Sciences, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan<sup>1</sup>; Department of Infectious Disease, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan<sup>2</sup>; Department of Gastroenterology, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan<sup>3</sup>; Department of Systems Life Sciences, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan<sup>4</sup>; Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan<sup>5</sup>; PRESTO, Japan Science and Technology Agent, Saitama, Japan<sup>6</sup>; and Department of Health Chemistry, School of Pharmacy, Iwate Medical University, Iwate, Japan<sup>7</sup>

Received 8 September 2009/Returned for modification 4 October 2009/Accepted 20 October 2009

**Shiga toxin 2 (Stx2) is a major virulence factor in infections with Stx-producing *Escherichia coli* (STEC), which causes gastrointestinal diseases and sometimes fatal systemic complications. Recently, we developed an oral Stx2 inhibitor known as Ac-PPP-tet that exhibits remarkable therapeutic potency in an STEC infection model. However, the precise mechanism underlying the in vivo therapeutic effects of Ac-PPP-tet is unknown. Here, we found that Ac-PPP-tet completely inhibited fluid accumulation in the rabbit ileum caused by the direct injection of Stx2. Interestingly, Ac-PPP-tet accumulated in the ileal epithelial cells only through its formation of a complex with Stx2. The formation of Ac-PPP-tet–Stx2 complexes in cultured epithelial cells blocked the intracellular transport of Stx2 from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum, a process that is essential for Stx2 cytotoxicity. Thus, Ac-PPP-tet is the first Stx neutralizer that functions in the intestine by altering the intracellular transport of Stx2 in epithelial cells.**

Infection with Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in humans causes gastrointestinal diseases that are often followed by potentially fatal systemic complications such as acute encephalopathy and hemolytic-uremic syndrome (12, 22, 25, 26). Stx is produced in the gut, traverses the epithelium, and passes into the circulation. Circulating Stx then causes vascular damage in specific target tissues such as the brain and the kidney, resulting in systemic complications. For this reason, development of a neutralizer that specifically binds to and inhibits Stx in the gut and/or in the circulation would be a promising therapeutic approach.

Stx is classified into two subgroups, Stx1 and Stx2. Stx2 is more closely related to the severity of STEC infections than Stx1 (6, 23, 31, 33). Stx consists of a catalytic A subunit and a pentameric B subunit. The former has 28S rRNA *N*-glycosidase activity and inhibits eukaryotic protein synthesis, while the latter is responsible for binding to the functional cell surface receptor Gb3 [Gal $\alpha$ (1-4)-Gal $\beta$ (1-4)-Glc $\beta$ 1-ceramide] (11, 17, 25). The crystal structure of Stx reveals the presence of three distinctive binding sites (i.e., sites 1, 2, and 3) on each B subunit monomer for the trisaccharide moiety of Gb3 (7, 16). Highly selective and potent binding of Stx to Gb3 is attributed mainly to the multivalent interaction between the B subunit pentamer and the trisaccharide. This so-called clustering effect has formed the basis for the development of several synthetic Stx neutralizers that contain the trisaccharide in multiple con-

figurations (3, 5, 14, 18, 19, 36). These neutralizers can strongly bind to Stx and inhibit its cytotoxic activity. Some are also effective in STEC infection models (18, 19, 36). However, the clinical application of these neutralizers has been substantially hampered by the synthetic complexity of the trisaccharide moiety.

We have recently screened a library of novel tetravalent peptides that exert a clustering effect and have identified four peptide motifs that are superior to trisaccharide in binding Stx (20). Tetravalent forms of these peptides bind with high affinity to one trisaccharide-binding site (site 3) of Stx2 and effectively inhibit Stx2 cytotoxicity. This is particularly true of the neutralizer designated PPP-tet, which contains four Pro-Pro-Pro-Arg-Arg-Arg motifs. PPP-tet protects mice from a fatal dose of *E. coli* O157:H7, even when the peptide is orally administered after the establishment of infection (20). Moreover, the addition of acetyl groups to all the amino termini of PPP-tet (yielding Ac-PPP-tet) makes this compound resistant to proteolysis and markedly enhances its protective activity against STEC infection, indicating that Ac-PPP-tet holds promise as a therapeutic agent for STEC infections.

After binding to Gb3, Stx is first transported to the Golgi apparatus in a retrograde manner and then transported to the endoplasmic reticulum (ER). On the other hand, the Stx catalytic A subunit is released into the cytoplasm, where it inhibits protein synthesis (27, 29). The retrograde transport of Stx is known to be essential for Stx cytotoxicity (2, 27, 28). In Vero cells, one of the cell types most sensitive to Stx, PPP-tet prevents Stx2 cytotoxicity by inducing the aberrant transport of Stx from the Golgi apparatus to an acidic compartment rather than to the ER, leading to the degradation of Stx (20). An advantage of PPP-tet is its ability to partially permeate cells,

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Life Sciences, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, 1-3 Miyakotani, Tatara, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan. Phone and fax: (81) 774-65-6471. E-mail: knishika@mail.doshisha.ac.jp.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 26 October 2009.

which allows it to inhibit the cytotoxicity of Stx2 already incorporated into cells (20). Nevertheless, the precise mechanism by which PPP-tet and Ac-PPP-tet function *in vivo*, as well as the identities of the organs or cells targeted by these compounds, is unknown.

To understand how orally administered Ac-PPP-tet functions *in vivo*, we investigated the effect of Ac-PPP-tet on fluid accumulation in the rabbit ileum caused by the direct injection of Stx2. The rabbit ileal loop system is highly valid for evaluating the toxicity of Stx2 produced in the intestine after infection. We also examined the localization of the tetravalent peptide and Stx2 in the intact rabbit ileum, cultured ileal specimens, and Caco-2 intestinal epithelial cells. Our results reveal that Ac-PPP-tet functions as a potent Stx2 neutralizer in the intestine by altering the intracellular transport of Stx2 in epithelial cells.

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** Recombinant Stx2 (21) and cholera toxin (34) were prepared according to published methods. Ac-PPP-tet and biotin-PPP-tet were prepared as described previously (20). Streptavidin-Alexa 488 was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Anti-Stx1 and anti-Stx2 mouse monoclonal IgG was obtained from Toxin Technology, Inc. (Sarasota, FL). Japanese white rabbits were obtained from Japan SLC (Shizuoka, Japan). The WST-1 cell counting kit was obtained from Wako Pure Industries (Osaka, Japan). Mouse anti-GM130 IgG monoclonal antibody was purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA), and mouse anti-Hsp47 monoclonal antibody was purchased from StressGen (San Diego, CA). Rabbit anti-Stx2 antiserum was provided by S. Yamasaki (Osaka Prefecture University, Japan). Stx2 conjugated with Alexa Fluor 488 at the amino groups, as well as Ac-PPP-tet conjugated with Alexa Fluor 555 at the single carboxyl group, was prepared using the Alexa Fluor protein-labeling kit (Invitrogen).

**Cell culture.** Caco-2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and were maintained in Dulbecco's modified essential medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 25 µg/ml amphotericin B. Caco-2 cells were plated at a density of approximately  $10^5$  cells/ml, grown to confluence for 3 days, treated with 2 mM butyric acid sodium salt for 4 days, and then used for experiments.

**Measurement of fluid accumulation.** Fluid accumulation induced by Stx2 in rabbit ileal loops was examined as described previously (8, 9). Conventional Japanese white rabbits (1.5 to 2 kg) were subjected to fasting for 18 h before surgery. Rabbits were anesthetized with thiopental sodium, and the intestines were exteriorized through a midline incision. In each loop, 8 to 10 segments (about 10 cm each) were ligated. One milliliter of saline or a solution of Stx2 (10 µg/ml saline) and a dose of the peptide compound were simultaneously injected into the loop. Cholera toxin (500 ng/ml saline in a 1-ml volume) served as a positive control. Eighteen hours after injection, rabbits were killed and the loops were excised. The ratio of the weight of the fluid-containing loop to the length of the loop (the fluid accumulation ratio, expressed in grams per centimeter) was calculated.

**Intestinal histopathology.** A portion of the ileal loop prepared as described above was removed, washed with cold phosphate-buffered saline (PBS), and immediately fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. The tissue was then embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin.

**Preparation of freshly isolated ileal blocks.** Fasting rabbits were anesthetized, and the ilea were exteriorized as described above. Small blocks (about 0.8 by 0.8 by 0.2 cm) containing the intestinal villi were collected from the ilea, washed with PBS, and cultured in a 24-well plate in Dulbecco's modified essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After a 1-h incubation of the blocks with Stx2 (10 µg/ml) and/or biotin-PPP-tet (1.4 mM), the blocks were fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned. The sections were then stained with hematoxylin and eosin.

**Localization of biotin-PPP-tet in the ileum.** Sections obtained from the embedded specimens were deparaffinized, and the endogenous peroxidase activities were blocked by incubating sections in a hydrogen peroxide solution for 20 min. Biotin-PPP-tet was detected with streptavidin-Alexa 488.

**Immunocytochemical staining.** Sections prepared from ileal blocks were deparaffinized, and endogenous peroxidase activities were blocked with a 20-min incubation in a hydrogen peroxide solution. For Stx2 immunostaining, sections were treated with blockase (DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan) for 30 min and then incubated with mouse monoclonal anti-Stx IgG (1 µg/ml) for 3 h at room temperature. The sections were then treated with anti-mouse IgG-tetramethyl rhodamine isocyanate for 1.5 h at room temperature.

**Cytotoxicity assay.** Caco-2 cells grown in a 96-well plate were treated with Stx2 (100 pg/ml) in the absence or presence of Ac-PPP-tet for 48 h. The relative number of living cells was then determined using a WST-1 cell counting kit according to the manufacturer's instructions.

**Intracellular localization of Stx2 and Ac-PPP-tet.** Caco-2 cells grown in a glass-base dish (35 mm in diameter) were treated with Alexa Fluor 488-labeled Stx2 (1 µg/ml) in the absence or presence of Alexa Fluor 555-labeled Ac-PPP-tet (16 µM) for 1 h at 4°C. The cells were then washed, incubated for the indicated time at 37°C, and analyzed by confocal laser scanning microscopy with an instrument from Olympus (Melville, NY). To examine the colocalization of Stx2 with a Golgi apparatus marker or an ER marker, we exposed Caco-2 cells to Stx2 (1 µg/ml) in the absence or presence of Ac-PPP-tet (49 µM) for 1 h at 37°C and then fixed the cells with 3% paraformaldehyde. Stx2 immunostaining was carried out by successively incubating cells with rabbit anti-Stx2 polyclonal antibody and Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG. Immunostaining for GM130, a Golgi apparatus marker, was performed using mouse anti-GM130 IgG monoclonal antibody and Alexa Fluor 546-labeled goat anti-mouse IgG. Immunostaining for Hsp47, an ER marker, was performed using mouse anti-Hsp47 monoclonal antibody and Alexa Fluor 546-labeled goat anti-mouse IgG.

To examine the complex formation by Ac-PPP-tet and Stx2 in Caco-2 cells, the cells were treated with Alexa Fluor 555-labeled Ac-PPP-tet (16 µM) for 30 min at 37°C. The cells were then washed and further incubated for 30 min at 37°C. The cells were cultured for 30 min in the presence or absence of Alexa Fluor 488-labeled Stx2 (1 µg/ml) and analyzed by confocal scanning microscopy.

#### RESULTS

**Tetravalent peptides inhibit Stx2-induced fluid accumulation in the rabbit ileum.** First, we examined the effect of Ac-PPP-tet (Fig. 1A) on fluid accumulation in the rabbit ileal loop caused by the direct injection of Stx2. Treatment with Stx2 induced marked fluid accumulation and bleeding, both of which reflect toxicity to ileum epithelial cells (Fig. 1B and C). The positive control, cholera toxin, also induced fluid accumulation. Coadministration of a high dose of Ac-PPP-tet (1.6 or 4.9 µmol) with Stx2 completely inhibited fluid accumulation, though coadministration of a low dose of Ac-PPP-tet (0.16 or 0.49 µmol) had less effect (Fig. 1B, C, and D). Biotin-PPP-tet had an inhibitory effect similar to that of Ac-PPP-tet (Fig. 1C), showing that biotin substitution for the acetyl groups at the amino termini of the tetravalent peptide does not alter activity against Stx2. Fluid accumulation levels in ileal segments treated with saline and those treated with either tetravalent peptide alone were comparable.

Histological analyses were performed on the ileum specimens used as described above to determine the effect of Ac-PPP-tet or biotin-PPP-tet on Stx2-induced pathological changes. Stx2 treatment was associated with severe ileal damage, particularly the extensive loss and degeneration of intestinal villi. Consistent with the ability of the tetravalent peptides to inhibit fluid accumulation, coadministration of Ac-PPP-tet or biotin-PPP-tet with Stx2 markedly reduced this damage (Fig. 2A). No damage was observed in ileal segments treated with saline or either tetravalent peptide alone (data not shown).

Analysis of the localization of biotin-PPP-tet by using streptavidin-Alexa 488 revealed that, in the presence of Stx2, biotin-PPP-tet efficiently accumulated mainly in the ileal epi-

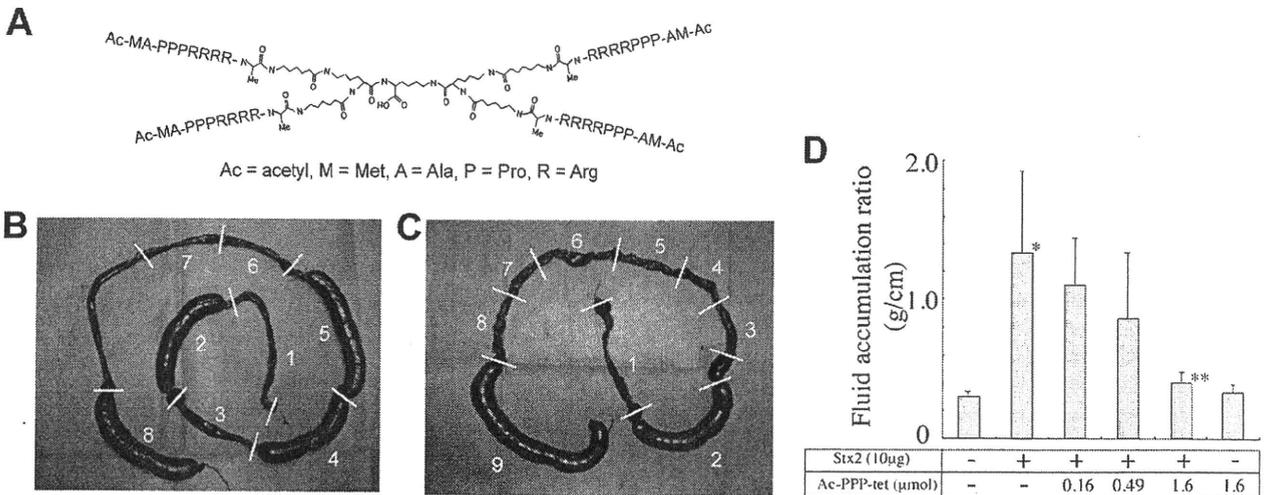


FIG. 1. Tetraivalent peptides inhibit Stx2-induced fluid accumulation in the rabbit ileal loop. (A) Structure of Ac-PPP-tet. Me, methyl. (B and C) Ileal loops were treated as indicated below and were excised after 18 h. (B) Segment treatments: 1, saline; 2, Stx2 (10 µg); 3, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (1.6 µmol); 4, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (0.49 µmol); 5, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (0.16 µmol); 6, Ac-PPP-tet (1.6 µmol); 7, saline; and 8, cholera toxin (500 ng). (C) Segment treatments: 1, saline; 2, Stx2 (10 µg); 3, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (1.6 µmol); 4, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (4.9 µmol); 5, Ac-PPP-tet (1.6 µmol); 6, Stx2 (10 µg) and biotin-PPP-tet (1.4 µmol); 7, Stx2 (10 µg) and biotin-PPP-tet (4.3 µmol); 8, biotin-PPP-tet (1.4 µmol); and 9, cholera toxin (500 ng). (D) Effect of Ac-PPP-tet on Stx2-induced fluid accumulation in ileal loops. Ileal loops were treated as indicated, and fluid accumulation ratios were determined. Values are means ± standard errors of three determinations. \*,  $P < 0.01$  for comparison to control, and \*\*,  $P < 0.05$  for comparison to treatment with Stx2 alone by an unpaired  $t$  test.

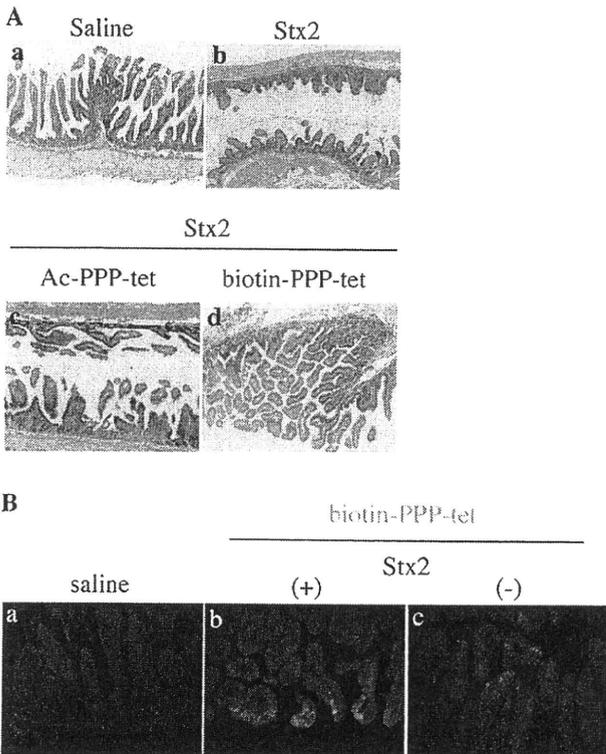


FIG. 2. Effect of Ac-PPP-tet on Stx2-induced ileal damage. (A) Hematoxylin and eosin staining of sections from the ileal loop subjected to the following treatments: a, saline; b, Stx2 (10 µg); c, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (1.6 µmol); and d, Stx2 (10 µg) and biotin-PPP-tet (1.4 µmol). (B) Localization of biotin-PPP-tet in the ileal mucosa by using streptavidin-Alexa 488. The ileal loop was subjected to the following treatments: a, saline; b, Stx2 (10 µg) and biotin-PPP-tet (1.4 µmol); and c, biotin-PPP-tet (1.4 µmol).

thelial cells rather than in the lamina propria. Much less accumulation of biotin-PPP-tet was observed in the absence of Stx2 (Fig. 2B). Previous in vitro studies by our laboratory have shown that both Ac-PPP-tet and biotin-PPP-tet (data not shown) form complexes with Stx2 and that these complexes are incorporated into Vero cells (20). This finding, taken with the present results, suggests that in the ileum the tetraivalent peptides and Stx2 form complexes that are incorporated into and accumulate in ileal epithelial cells.

**Tetraivalent peptides accumulate in ileal epithelial cells only in the presence of Stx2.** To understand whether tetraivalent peptides may form complexes with Stx2 in ileal epithelial cells, we investigated the colocalization of biotin-PPP-tet and Stx2 by using freshly isolated ileum blocks cultured in medium. After a 1-h incubation of the ileum blocks with Stx2, no pathological changes were observed (Fig. 3A), indicating that this incubation time is suitable for examining the distribution of Stx2 in tissues in the absence of any tissue damage. A 1-h incubation with biotin-PPP-tet and Stx2, but not biotin-PPP-tet alone, induced marked accumulation of the peptide in ileal epithelial cells (Fig. 3B), consistent with the Stx2-dependent accumulation of biotin-PPP-tet in the ileum described above. Immunohistochemical analysis using a Stx2-specific antibody confirmed that, after this time, Stx2 was incorporated into the villi, primarily the ileal epithelial cells lining the villi (Fig. 3C, panels a and b). In blocks treated with Stx2 and biotin-PPP-tet, the localization pattern of Stx2 merged well with that of biotin-PPP-tet, suggesting that tetraivalent peptides do in fact form complexes with Stx2 in ileal epithelial cells (Fig. 3C, panel c).

**Tetraivalent peptides inhibit Stx2 cytotoxicity by inducing aberrant cellular transport of Stx2 in epithelial cells.** To determine the precise mechanism by which tetraivalent peptides

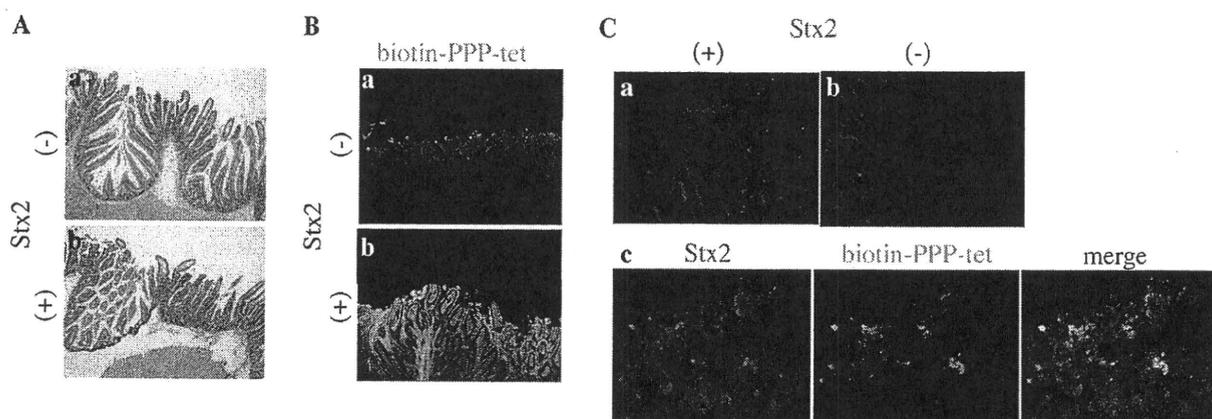


FIG. 3. Tetraivalent peptides accumulate in the ileal epithelial cells in a complex with Stx2. (A) Hematoxylin and eosin staining of sections obtained from the ileal blocks. The blocks were treated with PBS (a) or Stx2 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (b) for 1 h. (B) Localization of biotin-PPP-tet by using streptavidin-Alexa 488. The block was treated with PBS (a) or Stx2 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (b) in the presence of biotin-PPP-tet (1.4 mM) for 1 h. (C) Colocalization of Stx2 and biotin-PPP-tet by using anti-Stx monoclonal antibody and streptavidin-Alexa 488. Images show blocks treated with Stx2 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (a) and PBS (b), as well as blocks treated with Stx2 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) plus biotin-PPP-tet (1.4 mM) (c).

inhibit Stx2 cytotoxicity in ileal epithelial cells, we examined the effects of the peptides on the intracellular transport of the toxin by using Caco-2 cells, a human colon epithelial cell line. As shown in Fig. 4, Ac-PPP-tet efficiently protected Caco-2 cells against the cytotoxic effects of 100  $\mu\text{g/ml}$  Stx2, which resulted in 50% cell viability after a 2-day incubation. Biotin-PPP-tet had a dose-dependent protective effect almost identical to that of Ac-PPP-tet (data not shown). Next, we analyzed the intracellular localization of Alexa Fluor 488-labeled Stx2 after its binding to the surface receptor on Caco-2 cells. Time-

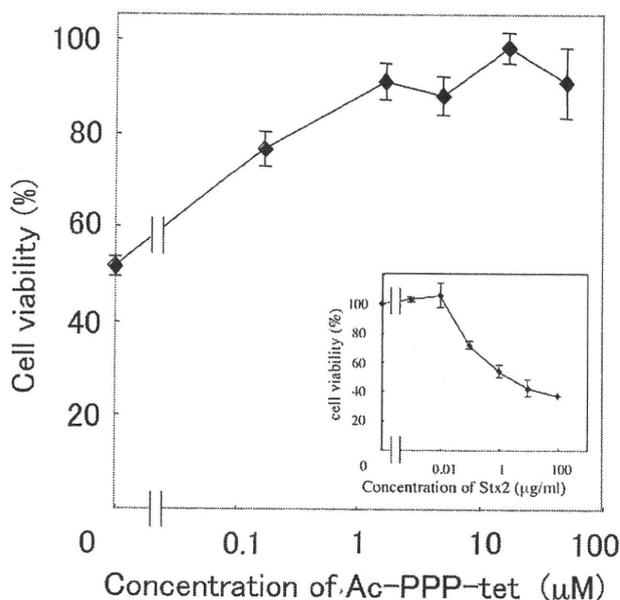


FIG. 4. Tetraivalent peptides inhibit Stx2 cytotoxicity in Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with Stx2 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) in the presence of Ac-PPP-tet for 48 h, and cell viability was determined. The inset shows the dose-dependent effects of Stx2 on Caco-2 cell viability. Data are expressed as percentages (means  $\pm$  standard errors;  $n = 3$ ) of the control value.

dependent localization of Stx2 to the Golgi apparatus was confirmed by colocalization with the Golgi apparatus marker GM130 (Fig. 5B). This localization pattern merged well with that of Alexa Fluor 555-labeled Ac-PPP-tet (Fig. 5A), suggesting that the peptide forms a complex with Stx2 and that this complex is then incorporated into the cells and transferred to the Golgi apparatus. In contrast, colocalization of Stx2 with the ER marker Hsp47 was completely inhibited by the presence of Ac-PPP-tet (Fig. 5C), indicating that the transport of Stx2 from the Golgi apparatus to the ER was specifically blocked by the presence of Ac-PPP-tet.

In order to further confirm the above conclusion, we examined whether Ac-PPP-tet could directly interact with Stx2 in living cells. After treatment of Caco-2 cells with Alexa Fluor 555-labeled Ac-PPP-tet, Ac-PPP-tet was substantially incorporated into and diffusely distributed in the cells. Following the addition of Alexa Fluor 488-labeled Stx2, Ac-PPP-tet was dynamically redistributed to the Golgi region, where it colocalized with Stx2 (Fig. 6). Such movement of Ac-PPP-tet was not observed in the absence of Stx2. These results indicate that Ac-PPP-tet can directly bind to Stx2 in living cells and that Stx2 is then transferred to the Golgi apparatus in a complex with Ac-PPP-tet.

## DISCUSSION

In the present study, we found that Ac-PPP-tet completely inhibited fluid accumulation and tissue damage in the rabbit ileum caused by the direct injection of Stx2 when Ac-PPP-tet and the toxin were administered simultaneously. Since the rabbit ileal loop system is highly suitable for evaluating the direct toxicity of Stx2 in intestinal epithelial cells, our finding clearly demonstrates that Ac-PPP-tet functions to protect epithelial cells from damage caused by the toxin. Our findings also suggest that the tetraivalent peptide accumulates in ileal epithelial cells only through the formation of a complex with Stx2. Thus, the mechanism of action of Ac-PPP-tet is likely to be different from that of other Stx neutralizers previously