

201131037B

厚生労働科学研究費補助金  
食品の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～23年度 総合研究報告書

研究代表者 高橋 美帆

平成 24 (2012) 年 5月

厚生労働科学研究費補助金  
食品の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～23年度 総合研究報告書

研究代表者 高橋 美帆

平成24(2012)年 5月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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

研究代表者：高橋 美帆（同志社大学生命医科学部）

----- 3

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 14

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

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

O157:H7 に代表される腸管出血性大腸菌感染症（STEC 感染症）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）や脳症などの重篤な合併症を併発する。STEC 感染症の主な病原因子は本菌が産生する Shiga toxin (Stx) である。Stx は AB5 型の毒素で、Stx1 と Stx2 のファミリーからなり、それぞれが複数のバリエーションをもつ。また本菌は複数種類の Stx を同時に産生することがあり、複数種の Stx が産生された場合の方が、重篤化移行率が高いことが知られている。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) 得られたペプチド性阻害薬の阻害メカニズムの解明を行うこと、さらに 4) 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。本研究では、1) 家畜牛糞便から 171 株、市販牛肉 15 株、臨床現場から 90 株の STEC 株を単離した。分離された STEC 株はほぼ stx1/stx2 あるいは stx2 単独陽性菌であり、さらに stx2d, stx2e, stx2O188 を実際に検出した。得られた情報をもとに、2) 独自に開発した多価型ペプチドライブラリー法ならびに新たに確立した多価型ペプチドシート合成技術を併用し、Stx2 バリエーションである Stx2d に対する阻害ペプチドモチーフの開発を行い、最終的に Stx2d に強く結合し、かつ Stx2 よりも Stx2d に対して高い阻害活性を有するペプチドモチーフ 2 種を同定することに成功した。3) Stx 阻害ペプチドの Stx 毒性阻害機構を明らかにすることを目的として、THP1 細胞を用いて Stx のアポトーシス誘導機構の解析と本機構に対する阻害ペ

プチドの効果を検討した。その結果、ペプチド性 Stx 阻害剤 (PPP-tet, MMA-tet) は Stx によるアポトーシス誘導に関わる分子の活性化を阻害しないこと、つまり全く新たな阻害機構を有している可能性があることが示された。

本研究により、多価型ペプチドライブラリー法と多価型ペプチドシート合成技術を併用することで Stx バリエーションに対する阻害ペプチドの同定が可能であることが示された。今後、産生 Stx に対応して各 Stx 阻害剤を組み合わせることで、最適化された新規 STEC 感染症治療法が確立されると期待される。

#### 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、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 AB5 型の毒素で、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 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が、その詳細については不明である。Stx は標的細胞膜上に存在する糖脂質 Gb3(gal-gal-glc-ceramide)に結合し、その B サブユニット 5 量体は Gb3 のグロボ 3 糖部を特異的に認識する。B サブユニット 1 分子には 3 種類のグロボ 3 糖結合部位 (サイト 1-3) が存在し、5 量体では最大 15 分子のグロボ 3 糖が結合し、結合親和性を著しく亢進させている。この現象をクラスター効果という。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

ライブラリー法を独自に開発し、本法を用いて臨床上重篤化と関係の深い *Stx2* のグロボ3糖結合部位の1つのサイト3を標的として *Stx2* の毒性を抑制する新規ペプチド性阻害薬 (PPP-tet) の同定に成功した (PCT/JP2005/012286、K.Nishikawa et.al., FASEBJ.,2006)。マウスの O157:H7 感染実験において、PPP-tet は *Stx2* によるマウスの致死性を著しく抑制することが示された。さらに興味深いことに 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ことにより *Stx2* の毒性を抑制していた。すなわち、*Stx* の細胞内輸送の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いだした。本研究は本概念に立脚し 1)近畿地方の食肉牛、食品、臨床現場、それぞれから STEC 株を分離し、STEC 血清型、*Stx* 遺伝子、*Stx* バリエントを同定すること、2)1)で得られた情報をもとに、多価型ペプチドライブラリー法と、今回新たに確立した多価型ペプチドシート合成技術(特願 2010-019731)を併用し、各 *Stx* バリエントに対する特異的阻害ペプチドモチーフを開発すること、3)さらに同定された *Stx* 阻害ペプチドの *Stx* 毒性阻害機構の解析を行うことを目的とする。従来の技術では *Stx* の阻害薬開

発自体が非常に困難であったことから本研究により新規治療法の確立が可能になると期待される。

## B. 研究方法

### 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。

### 2) 各 *Stx* バリエント特異的制御分子の開発

—多価型ペプチドライブラリー法と多価型ペプチドシート合成技術を併用した *Stx2* バリエン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、精製を行った。得られたヒスチジンタグ B サブユニットの受容体結合能は

ELISA および Biacore を用いて検討した。また同様に、Stx2dB サブユニットのサイト 1 (N16ABH)あるいはサイト 3 (W29ABH)に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。

Stx2dB サブユニット上の受容体結合部位であるサイト 1 に対する阻害ペプチドを同定するため、ヒスチジントグサイト 1 変異体 N16A(N16ABH)と、ヒスチジントグ Stx2dB サブユニット(2dBH)を用いて多価型ペプチドライブラリースクリーニングを行った。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。

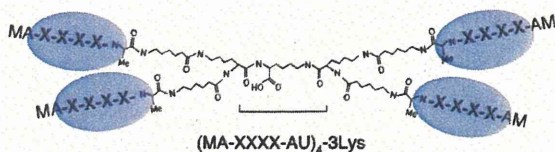


図 1 多価型ペプチドライブラリー

新たに多価型ペプチド合成技術を開発した(特願 2010-019731)。本技術は、Intavis AG 社のペプチド合成機 ResPepSLD を用い、専用セルロースシート上に最大 384 種類の多価既知配列ペプチドをスポット合成することができる。このとき、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(図 2)。125I 標識した Stx2B サブユニット(2BH)と 2dBH を用いて、シート上の 56 種類既知配列ペプチドとの結合活性を検討した。また、4 価 Stx 阻害ペプチドを合成し、ベロ細胞を用いて Stx 細胞障害活性阻害効果を検討した。マウスの STEC 感染実験は、5 週齢の雄 BALB/C と、STECO157V17 株 (Stx1/Stx2) を用いて行った。

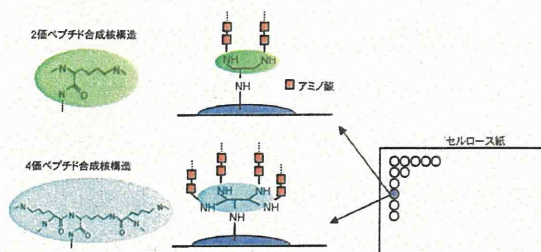


図 2 多価型ペプチドシート合成技術

### 3) Stx阻害ペプチドのStx毒性阻害機構の解析—Stxによる細



## 胞死誘導機構と細胞死制御分子の開発—

THP1 細胞を Stx で処理し、細胞の形態観察及び色素排除法等で 24 時間以内に細胞死を起こす細胞株を探索した。Stx 処理細胞の Cell Lysate を調製し、各種タンパク質の発現及びカスパーゼ活性化等をウェスタンブロット法により解析した。

(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った。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

#### 1) 臨床および環境分離 STEC 株の分離同定

現在までに、食品 47 検体から 15 株、食肉牛 900 検体から 171 株、臨床患者 1171 検体から 90 株の STEC 株が分離された。牛から単離された

STEC 株の血清型は、O22:H8、O130:H24、O17:H11、O153:H25 であり、*stx* 遺伝子は、O22:H8 と O153:H25 は *stx1* と *stx2* の両陽性、O130:H24 と O17: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、O157:H7、O157:H- O26:H-, O26:H11、O145: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。また、バリエントは Stx2d, Stx2e, Stx2-0118 を検出した。

#### 2) 各 Stx バリエント特異的制御分子の開発

—多価型ペプチドライブラリー法と多価型ペプチドシート合成技術を併用した Stx2 バリエント特異的なペプチド性阻害薬の同定—

作成した 2dBH の、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。2dBH のサイト 1 変異体(N16ABH)についても同様に、Gb3 結合能が消失していること、Biacore により 5 量体構造は維持していることを確認し、以下の多価型ペプチドライブラリースクリ



ーニングに用いた。

Stx2dB 上のサイト1結合部位特異的阻害ペプチドを同定するために、N16ABH とのサブトラクションによる多価型ペプチドライブラリースクリーニングを複数回行った。ライブラリーは (MA-XXXX-AU)<sub>4</sub>-3Lys、(MA-XXXRXXX-AU)<sub>4</sub>-3Lys、(MA-XXRXXRXX-AU)<sub>4</sub>-3Lys、(MA-XXXRRRR-AU)<sub>4</sub>-3Lys をそれぞれ用いた (U=アミノヘキサ酸、XはCysを除く19種類のアミノ酸を示す)。その結果、いずれのライブラリーを用いた場合でも、Xの各ポジションには塩基性アミノ酸 (Arg または His) が選択されることがわかった。次に、多価型ペプチドシート合成技術を用い、計56個の既知配列多価ペプチドに対する<sup>125</sup>I標識2dBH、N16A、2BHの結合活性を検討した。その結果、最終的に2dBHに対し強い結合活性をもち、かつ2BH、N16Aと比較し結合特異性が高い多価ペプチドモチーフを8種類同定した (配列出願準備中)。次に、得られた8種類の多価ペプチドモチーフについて、Stx2、Stx2dのベロ細胞障害活性に対する阻害効果をそれぞれ検討したところ、4種類のペプチドモチーフは、Stx2d存在下ベロ細胞生存率が80%以上上昇した。とくに2種類のペプチドモチーフについては、Stx2よりもStx2d

に対して強い阻害活性を示すことが明らかとなった(図3)。

次に、個体レベルでの阻害ペプチドの効果を検討するために、マウスO157感染実験系の確立を行った。マウスにO157V17株を投与後、マイトマイシンC投与したところ、10日以内に50%以上のマウスが死亡した。現在、阻害ペプチド投与に向けて準備中である。

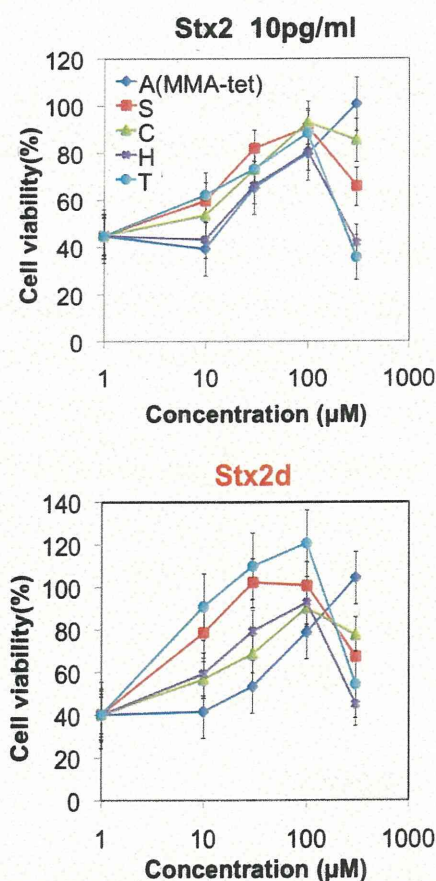


図3 多価ペプチドのStx細胞障害活性阻害効果

### 3) Stx阻害ペプチドのStx毒性阻害機構の解析—Stxによる細胞死

## 誘導機構と細胞死制御分子の開発

ヒト急性単球性白血病細胞株 THP1 細胞を用いて Stx1、Stx2 によるアポトーシス誘導の影響を検討した。その結果、Stx1、Stx2 いずれも低濃度 (5pg/ml) で 6 時間以内に THP1 細胞に細胞死を誘導すること、このときカスパーゼ 3 の活性化と PARP の切断がおこることがわかった。また、Stx1、Stx2 処理により細胞死阻害タンパク質の FLIP が速やかに消失すること、プロテアソーム阻害剤の MG132 により FLIP の消失および THP1 細胞のアポトーシスは強く阻害されることがわかった。次に、これまでに我々が開発したペプチド性 Stx2 阻害剤 PPP-tet, Stx1/Stx2 阻害剤 MMA-tet の Stx による THP-1 アポトーシス誘導に対する効果を検討した。その結果、Stx による THP1 細胞のアポトーシスは MMA-tet, PPP-tet によって阻害されなかった。

### D. 考察

初年度を含め現在まで、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、両陽性株であった。またバリエーションについては、市販食肉から *stx2d*, *stx2-O188*,

*stx2e*、さらに型別できない *stx1* 遺伝子をもった STEC が検出された。患者からは *stx2d* が検出された。今後、得られたすべてのバリエーションに対する阻害ペプチドを同定する予定である。

2)では、2dBH と N16ABH を用いた多価型ペプチドライブラリースクリーニングの結果から、塩基性アミノ酸 (Arg, His) が強く選択されることがわかった。このことは、2dBH のサイト 1 に強く結合するためには塩基性アミノ酸が必須であることを示している。しかしながら、2BH への結合にも塩基性アミノ酸は必須であることがわかっており、両者は共通している。したがって当初の想定どおり、バリエーション間の微細な構造を見分ける特異性の高い阻害ペプチドを取得するのは本法のみでは困難であると考えられた。そこで、新たに開発した多価型ペプチドシート合成技術を用い、2dBH 特異的なペプチドモチーフの探索を試みた。Stx2dB サブユニットは Stx2B サブユニットと比べて 2 アミノ酸異なるにすぎない。それにもかかわらず、Stx2 と Stx2d では一連のペプチドモチーフに対し、異なった結合活性を示すことが明らかとなった。最終的に、2dBH に強く結合し、Stx2d の毒性を抑制するペプチドモチーフを計 8 種同定することができ、さらに Stx2 に比べ Stx2d に対する阻害

活性の強いペプチドモチーフを2種同定した。この結果は、本法を用いてバリエーション特異的な阻害ペプチドを各々同定することが原理的に可能であることを証明している。今後、その他のバリエーションについても、阻害ペプチドを同定することができれば、さまざまな STEC 株により引き起こされる集団感染に対し、その産生毒素に基づいて最適化された新規治療法の確立が可能になると期待される。また最近、これまでに同定された Stx2 阻害ペプチド PPP-tet が、サルにおいても Stx2 の致死毒性を顕著に抑制することが証明された (Steams-Kurosawa D.J, et., *Pediatr. Nephrol.*, 2011)。今後、PPP-tet を含め、その他の一連の Stx 阻害ペプチドの臨床応用が期待される。

3) について、これまでに得られてきた Stx 阻害ペプチドは、Stx の標的細胞への侵入を阻害するのではなく、その作用点は Stx の細胞内輸送をはじめとする細胞内イベントにあることが明らかになっていたがその詳細は不明であった。今回、Stx 阻害ペプチドである PPP-tet、MMA-tet を用いた検討から、PPP-tet、MMA-tet はいずれも予想に反して Stx によるアポトーシス誘導に関わる分子の活性化を阻害しないことがわかった。このことは、PPP-tet および MMA-tet は全く新た

な Stx 毒性阻害機構を有している可能性があることを意味している。

## E. 結論

家畜牛糞便、市販牛肉、臨床から STEC 株計 276 株を分離した。分離された STEC 株は、ほぼ stx1/stx2 両陽性菌あるいは stx2 単独陽性菌であった。バリエーションは stx2d, dtx2e, stx2-O188 を検出した。

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た。このうち Stx2d サイト 1 変異体 N16ABH を用いて多価型ペプチドライブラリー法、および多価型ペプチドシート合成技術によるスクリーニングを行ない、最終的に Stx2d のサイト 1 に強く結合し、Stx2 よりも Stx2d に対して高い阻害活性をもつ多価ペプチドモチーフを2種類同定した。

これまでに我々が開発したペプチド性 Stx 阻害剤 PPP-tet, MMA-tet の、Stx 毒性阻害作用は、Stx によるアポトーシス関連分子の活性化阻害によらない新たな作用機構の可能性がある。

## 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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Demizu, Y., Okuhira, K., Motoi, H., Ohno, A., Shoda, T., Fukuhara, K., Okuda, H., Naito, M. & Kurihara, M.: Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy. **Bioorg Med Chem Lett** 22, 1793-1796 (2012)
- 7) Okuhira, K., Ohoka, N., Sai, K., Nishimaki-Mogami, T., Itoh, Y., Ishikawa, M., Hashimoto, Y. & Naito, M.: Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein. **FEBS Lett** 585, 1147-1152 (2011).
- 8) Itoh, Y., Ishikawa, M., Kitaguchi, R., Sato, S., Naito, M. & Hashimoto, Y.: Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown. **Bioorg Med Chem** 19, 3229-3241 (2011)
- 9) N. Sugimoto, K. Shima, A. Hineno

ya, M. Asakura, A. Matsuhisa, H. Watanabe, and S. Yamasaki. Evaluation of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay for Molecular Epidemiological Study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Vet. Med. Sci.*, 73: 859-867, 2011

## 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
- 3) 三井貴瑛、章白浩、高橋美帆、山崎伸二、西川喜代孝 ; バリエント特異的 Stx 阻害薬開発のための新規スクリーニング法の開発. 第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2011 年 7 月 15 日、大阪
- 4) 三井貴瑛、高橋美帆、山崎伸二、西川喜代孝 ; バリエント特異的 Stx 阻害ペプチドの新規スクリーニング法の確立. 第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 29 日、長崎
- 5) 山本洋、高橋美帆、濱端崇、西川喜代孝 ; 受容体結合部位を標的とした新規コレラ毒素阻害薬の開発. 第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 29 日、長崎
- 6) 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
- 7) 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)
- 8) 大岡 伸通、内藤 幹彦 : Molecular analysis of regulatory mechanism of TNF $\alpha$ -inducible apoptosis increased by depletion of cIAP1 expression、第 69 回 日本癌学会学術総会 (2010. 9) (大阪)
- 9) 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)
- 10) 服部 隆行、大岡 伸通、高橋 美帆、西川 喜代孝、内藤 幹彦 : シガトキシン B サブユニットによる細胞死誘導機構 日本薬学会第 132 年会 (2012. 3) (札幌)
- 11) 奥平 桂一郎、出水 庸介、大岡 伸通、柴田 識人、服部 隆行、最上

(西巻) 知子, 栗原 正明, 奥田 晴宏, 内藤 幹彦: プロテインノックダウン法によるエストロゲンレセプターの分解 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011. 10、名古屋)

12) 内藤幹彦: 抗がん剤、がん分子標的治療薬の作用機序と薬剤耐性の分子機構 第 55 回日本薬学会関東支部大会 (2011. 10、船橋)

13) 日根野谷 淳、島 綾香、向澤奈津子、丹羽裕子、四良丸 幸、西川明芳、朝倉昌博、山崎伸二: 市販牛肉における志賀毒素産生性大腸菌の汚染状況、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月、大阪

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 およびこれを含有する CaMKII 阻害剤、特許出願番号; 特願 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

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
<u>Watanabe-Taka</u> <u>hashi M</u> , Sato T, Dohi T, Noguchi N, Kano F, Murata M, Hamabata T, Natori Yand 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, <u>Hinenoya</u> , <u>A</u> , Taguchi T, Na gita A, Shima K, Tsukamoto T, Sug imoto N, Asakura M, and <u>Yamasak</u> <u>i S.</u>	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, Sai K, Nishimaki-Mogami T, <u>Naito M.</u>	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
Demizu, Y., Okuhira, K., Motoi, H., Ohno, A., Shoda, T., Fukuhara, K., Okuda, H., <u>Naito, M.</u> & Kurihara, M.	Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy.	<b>Bioorg Med Chem Lett</b>	22	1793-1796	2012

Okuhira, K., Ohok a, N., Sai, K., Ni shimaki-Mogami, T., Itoh, Y., Ishik awa, M., Hashimo to, Y. & <u>Naito, M.</u>	Specific degradation of CR ABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein.	<b>FEBS Lett</b>	585	1147-11 52	2011
Itoh, Y., Ishikawa, M., Kitaguchi, R., Sato, S., <u>Naito, M.</u> & Hashimo to, Y.	Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown.	<b>Bioorg Med Chem</b>	19	3229-32 41	2011
N. Sugimoto, K. Shima, A. <u>Hineno ya, M.</u> Asakura, A. Matsuhisa, H. Watanabe, and <u>S. Yamasaki</u>	Evaluation of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay for Molecular Epidemiological Study of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> .	<b>J. Vet. Med. Sci.</b>	73	859-867	2011

## 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-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-

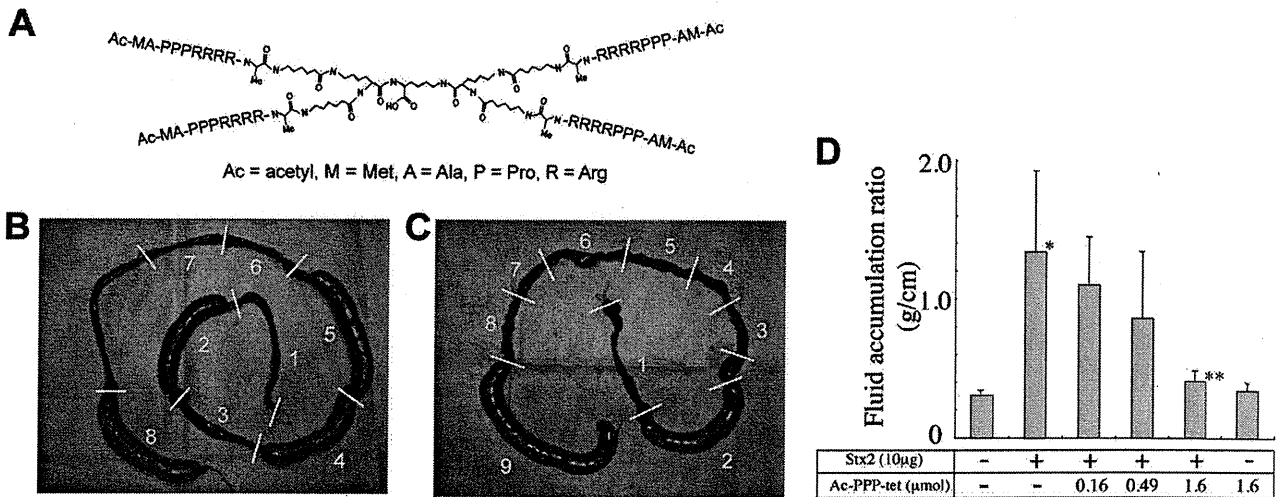


FIG. 1. Tetraivalent peptides inhibit Stx2-induced fluid accumulation in the rabbit ileal loop. (A) Structure of Ac-PPP-tet. Me, methyl. (B and C) Ileal loops were treated as indicated below and were excised after 18 h. (B) Segment treatments: 1, saline; 2, Stx2 (10 µg); 3, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (1.6 µmol); 4, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (0.16 µmol); 5, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (1.6 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 (4.9 µmol); 4, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (1.6 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.

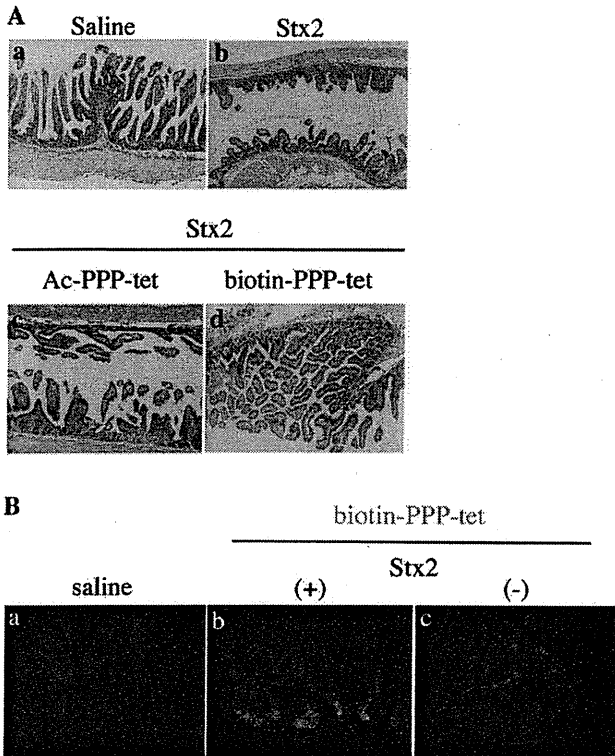


FIG. 2. Effect of Ac-PPP-tet on Stx2-induced ileal damage. (A) Hematoxylin and eosin staining of sections from the ileal loop subjected to the following treatments: a, saline; b, Stx2 (10 µg); c, Stx2 (10 µg) and Ac-PPP-tet (1.6 µmol); and d, Stx2 (10 µg) and biotin-PPP-tet (1.4 µmol). (B) Localization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