

課題番号 : 24指110  
研究課題名 : コレラ及び腸管毒素原性大腸菌感染症に対する新規予防・治療法の開発  
主任研究者名 : 濱端 崇  
分担研究者名 : 濱端 崇・岡村匡史・西川喜代孝  
キーワード : 細菌性下痢症、ペプチド性中和剤、付着因子 CS6、細胞侵入、細菌感染マウスモデル  
研究成果 :

#### 1. 目的

世界的に猛威を振るうコレラと腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 感染症の制圧に向け、ETEC の主要な付着因子である CS6 の付着・細胞侵入メカニズムの解明、下痢の主要因である毒素の中和剤の開発を行うとともに、マウス感染モデルを開発しコレラ・ETEC 感染症の予防・治療法の評価を行う。

#### 2. 研究成果

(濱端)

##### 1) ETEC 付着因子 CS6 の付着メカニズムの解明

細胞への付着が強い 4266 株と付着の弱い 3020 株の CS6 遺伝子を比較したところアミノ酸配列は C<sub>ss</sub>A で 13 カ所、C<sub>ss</sub>B で 5 カ所異なっていた。そこで両株の差異を元に種々の変異 CS6 を作製し、実験室株大腸菌 TOP 10 に発現させ INT407 への付着を調べ、CS6 の付着に重要なサブユニットとアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、CS6 の付着を担っているのは C<sub>ss</sub>B の 118 番目のリジンであることを見出した。また多くの ETEC 付着因子と異なり、CS6 の付着はマンノース非感受性であった。

##### 2) CS6 依存的な細胞侵入メカニズムの解明

ETEC のみならず実験室株大腸菌でも CS6 依存的に大腸上皮由来 Caco-2 細胞に侵入することを明らかにした。さらに種々の阻害実験によりこの細胞侵入は PI3K-Akt 経路とそれに関連するチロシンキナーゼを活性化することによりアクチン重合が活性化され、菌を取り込むことにより起こることを明らかにした。一方、他の菌で細胞侵入に関与すると報告のある Src や PKC は CS6 依存的細胞侵入には関与しなかった。また細胞侵入した菌は後期エンドソーム中でも死滅せず増殖することが示唆された。

この CS6 依存的 ETEC の細胞侵入の意義を調べるため、摘出したマウス腸管に直接菌を投与し腸管上皮細胞への菌の侵入を検出する事が出来るかを確かめたところ、空腸および大腸では細胞侵入し、回腸では細胞侵入しないことが示唆された。この結果は CS6 依存的な菌の細胞侵入が小腸由来の INT407 細胞ではほとんど起こらず、Caco-2 を始め他の細胞では効率よく起こる事を反映している。CS6 依存的 ETEC の細胞侵入の意義については引き続き検討中である。

##### 3) CS6 遺伝子の発現調節メカニズムの解明

CS6 の転写調節因子を特定するため、ETEC 総タンパクとのゲルシフトアッセイでシフトが観察された CS6 遺伝子上流断片をプローブとして、プルダウンによる結合タンパクの抽出およびファージディスプレイライブラリーからの結合クローンの単離を試みたが、いずれも失敗に終わった。そこで CS6 プラスミドの全塩基配列を決定し、調節因子の検索を試みた。カナマイシン (Km) 耐性遺伝子カセットを ETEC4266 株の *cssB* に相同組換えし、全プラスミドを抽出して大腸菌 TOP10 株に形質転換し、Km 耐性を指標に選択して当該プラスミドを分離した。その全塩基配列を次世代シーケンサーおよび Gap filling PCR によって決定した。このプラスミド (pC<sub>ss</sub>165) は 165 kb と他の付着因子プラスミドよりもかなり大きく、また 24.4%が挿入配列であった。アノテーションの結果、このプラスミドの選択に有利に働く可能性のある種々の遺伝子が同定された。調節因子として報告のある *csvR* および *araC* が見いだされたが、ETEC4266 株でこれらの遺伝子を欠損したところ、細胞付着も CS6 発現も影響を受けなかったことから、CS6 の調節因子はこのプラスミド以外にコードされていると推測された。

##### 4) C<sub>ss</sub>A と C<sub>ss</sub>B の結合メカニズムの解析

CS6 の構成タンパク質である C<sub>ss</sub>A および C<sub>ss</sub>B サブユニットは、1:1 のモル比で存在し、K<sub>d</sub> が 3.2 pM という極めて強い結合をしている事をすでに明らかにしている。この強い結合の機構を解明するため、結晶解析から結合への関与が示唆されている各サブユニットの N 末および C 末を中心にアミノ酸をアラニンに 1 残基置換した一連の変異 CS6 を作製し、その発現および菌の細胞付着を解析した。その結果いくつかのアミノ酸残基が C<sub>ss</sub>A-C<sub>ss</sub>B のアセンブリおよびシャペロン C<sub>ss</sub>C との相互作用による C<sub>ss</sub>A、C<sub>ss</sub>B それぞれの安定化に強く関与している事がわかった。

(西川)

## 1) CTならびにLTに対する新規ペプチド性阻害薬の開発

コレラ毒素 CT ならびに大腸菌易熱性毒素 LT は、B-サブユニット (CTB, LTB) を介して標的細胞表面の糖脂質 GM1 に結合する。そこで、CTB, LTB の受容体結合領域に種々のアミノ酸に変異を有する一連の変異体を調製した。CTB については、GM1 の末端 Gal 結合部位に変異を有する変異体 (CTB-E51A, CTB-K91A)、GM1 の末端シアル酸結合部位に変異を有する変異体 (CTB-E11A, CTB-Y12A, CTB-H13A) を作製し、CTB-E51A, CTB-E11A では GM1 との結合親和性が 1/3-1/5 に低下していること、CTB-Y12A では結合親和性は不変だが最大結合量が 25%低下していることを見出した。LTB についても同様の変異体を作製したが、CTB と異なり、LTB-E51A, LTB-E11A では GM1 との結合親和性は不変で最大結合量がそれぞれ 50 ならびに 30%低下していた。

変異体 CTB-E51A を用いて、多価型ペプチドライブラリーの 1 次、2 次、3 次スクリーニングを行い、CTB 結合モチーフを同定した。さらに ELISA 法にて、本モチーフを 4 個有する多価型ペプチド性化合物 (GGR-tet) が E51 依存的に CTB に結合することを見出した。また GGR-tet は、CT によって誘導される CHO 細胞の形態変化を特異的に抑制すること、一方 CTB 結合配列を持たない核構造のみの化合物 (MA-tet) では全く阻害能が認められないことから、GGR-tet は特異的に CTB に結合することにより CT 阻害能を発揮することがわかった。しかし GGR-tet は、Caco2 細胞での CT の cAMP 産生増加能に対してはほとんど阻害効果を示さなかった。そこで GGR-tet の配列をベースとして多価型ペプチドシート合成技術を用いたスクリーニングを行うことにより、新規多価型ペプチド性化合物 (YGR-tet, GNR-tet) を開発した。YGR-tet ならびに GNR-tet は、CT の CHO 細胞形態変化誘導能ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能を共に効率よく阻害した。さらにマウス腸管ループ実験により、GNR-tet は CT 投与による水分貯留を有意に抑制することを見出した。

LT については、野生型 LTB および GM1 の末端 Gal 結合部位変異体 LTB-E51A を用いた多価型ペプチドライブラリー法により新規化合物 (AAR-tet) を同定した。AAR-tet は、LT による CHO 細胞形態変化誘導能ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能を効率よく阻害した。また GGR-tet をベースとして多価型ペプチドシート合成により新規化合物 (NNR-tet, ENR-tet) を同定した。AAR-tet, NNR-tet ならびに ENR-tet は、CHO 細胞形態変化誘導能ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能を効率よく阻害した。興味深いことに CT 阻害薬として同定した GGR-tet は、CT による Caco2 細胞での cAMP 産生増加能をほとんど抑制しないにもかかわらず、LT による cAMP 産生増加能を強力に阻害することが示された。この結果は、CT と LT は高い相同性を有するものの、各々に対する最適阻害モチーフは異なっており、個別に阻害薬開発をすることが必要かつ可能であること示している。マウス腸管ループを用いて LT による水分貯留の系を確立した。この系を用い LT 投与に対する GGR-tet の効果を検討したところ、LT による水分貯留を GGR-tet は顕著に抑制することを見出した。

## 2) ペプチドライブラリーアレイスクリーニングのための STh 標識プローブの調製

STh は 19 アミノ酸から構成されるペプチドで、一分子中に 3 個の S-S 結合を有しており、大腸菌発現系での調製は困難である。そこでペプチド合成機により STh 最小活性部位から構成される STh (5-18) を合成し、空気酸化により S-S 結合を形成させ、逆相 HPLC を用いて高純度標品を精製した。

STh は内因性ペプチドであるグアニリンと同様に、細胞膜表面に存在しているグアニレートサイクラーゼに結合し活性化することにより、細胞内の cGMP 濃度の増加を引き起こす。そこで、精製 STh (5-18) の活性を評価するため、Caco2 細胞を用いた cGMP 産生能を高感度に検出する系の確立を検討した。細胞由来 cGMP 産生の定量には PerkinElmer 社の AlphaLISA を用いた。Caco2 細胞は butyrate によって分化誘導するのではなく、22-25 日間培養することによりゆっくりと分化させた場合にグアニリンによる cGMP 産生応答性が獲得できることを確認した。この系を用いて Caco2 細胞を STh (5-18) で刺激したところ、容量依存的に cGMP 産生能が亢進することが確認できた。

次に STh のペプチドライブラリーアレイを用いて STh に高親和性を示すペプチド性化合物を同定するため、精製 STh (5-18) をビオチン化した。またこのビオチン化 STh (5-18) の生物活性を上述した Caco2 細胞の系で確認したところ、cGMP 産生能増加能力を保持したまま STh のプローブ化に成功したことがわかった。さらに、スクリーニング時のサブトラクションに使用する、受容体結合部位に変異を有するビオチン化変異体 STh (5-18) A14G の調製を試みた。目的とする配列のペプチドを合成後、空気酸化

により S-S 結合を形成させ、逆相 HPLC による精製を行った。その結果 2 本のメインピークが観察されたが、活性変異体であるため cGMP 産生能増加能力による判別が困難であった。そこで各分画について NMR 解析を行い、野生型には存在しない G14 に由来するプロトンのピークが観察された分画を目的とする STh(5-18) A14G と判断し、ビオチン化を行った。得られたビオチン化 WT-STh(5-18)ならびに STh(5-18) A14G を用いて、Caco2 細胞での cGMP 産生能増加能力を検討した。WT については未標識体に比べると活性は 1/5 に低下するものの十分な活性を保持しており、ビオチン化 STh(5-18) A14G は WT に比べるとさらに活性が 1/4 に低下していた。この結果から、スクリーニング時のサブトラクションに十分使用できるプローブが調製できたと判断した。現在、ペプチドライブラリーアレイをスライドガラス上に作製する技術の確立を進めており、作製でき次第今回作製したプローブを用いて部位特異的 ST 阻害モチーフの同定を推進する。

(岡村)

#### 1) 近交系マウスを用いたコレラ・ETEC 易感染マウスの選抜

近交系マウス Balb/c、B57BL/6、A/J、AKR、C3H/He、DBA/2、FVB の 7 系統にコレラ菌 N16961 株および ETEC4266 株を経口投与し排菌数を経時測定することにより腸管内に菌が滞留しやすい易感染系統を検索した。コレラ菌ではほぼ全系統で 2 日目までに排菌が終了した。ETEC では一部の系統で 4 日目以降も排菌が認められ、特に DBA/2 は高い排菌数を示し 3 匹中 2 匹で 8 日目まで排菌が継続した。また Balb/c と AKR は各 1 匹が 2 日目から測定を終了する 10 日目まで比較的低レベルの一定の排菌を示したことから、ETEC のキャリア化が示唆された。追試においても上記と同じ結果が得られたため、コレラ菌については保留、また ETEC については DBA/2 を易感染マウスのバックグラウンド最有力候補と決定した。

#### 2) ETEC 付着因子 CS6 の宿主レセプターの探索

CS6 のレセプター候補であるフィブロネクチンならびにムチン 2, 3A 遺伝子の発現を ETEC 強付着の INT-407 および低付着の Caco-2 で RT-PCR により調べたところ、Caco-2 で明らかに多く、菌の付着量とは逆の結果となった。そこで他のレセプター候補を網羅的に探索するため、両細胞の RNA アレイを行い、さらに RT-PCR により、Caco-2 より INT-407 で発現の多い細胞外マトリクス関連遺伝子 7 つを新たな候補として見いだした。

一方、CS6 の糖鎖結合性を糖鎖および糖脂質糖鎖固定化アレイで解析したところ、ヘパリンとヘパリン脱硫酸化物に強く結合することがわかった。さらに CS6 の構成サブユニットである CssA および CssB を別々に糖鎖固定化アレイで解析したところ、CssB はヘパリンのみに結合したのに対し、CssA は CS6 と同様の強度でヘパリンとヘパリン脱硫酸化物に結合し、さらに Lacto-N-neotetraose (LnNT) にも弱く結合した。しかし付着実験では、ヘパリンは ETEC 4266 株の INT407 細胞への付着を量依存的に阻害したが、LnNT は阻害しなかった。CS6 の結合を担うのは CssB の 118 番目のリジンであることから、CS6 による付着はリジンの正電荷とヘパリン硫酸基の負電荷の結合である可能性が考えられた。ヘパリンはグリコサミノグリカンなので、ヘパリンが真の CS6 宿主レセプターだとすると単一遺伝子の導入だけで易感染マウスを作製するのは困難である。そこでヘパリンが本当に CS6 のレセプターであるのかを確認するため、CssB の 118 番目の K のみを弱付着型 CS6 サブタイプのアスパラギン (N) に変異させた CS6 (CssB K118N) 遺伝子を実験室大腸菌株 TOP10 に導入し、この形質転換株から CS6 (CssB K118N) タンパクを精製し、糖鎖アレイ解析により糖鎖結合選択性の変化を調べた。その結果は、依然ヘパリンが陽性で、かつ LnNT にも弱く結合が見られるという、CssA 単独の糖鎖結合プロファイルに酷似していた。すなわち、CssB のヘパリンへの結合が激減したため、CssA 単独の結合プロファイルに近づいたと考えられた。さらに前出の形質転換 TOP10 株から PCR で CssB K118N 遺伝子を単離し、新たに発現ベクターにリクローニングし、His タグによる抽出の後 His タグを除去し精製した。この精製 CcssB K118N を用いて糖鎖アレイ解析を行った結果、ヘパリンとの結合性は減弱したものの、野生型 CcssB の 70%程度残っていた。したがって、CS6 は CcssA、CcssB ともに強く陽性に荷電しているため陰性に荷電しているヘパリンには強く結合するものの、CcssB の 118 番目のリジンを責任アミノ酸とする特異的結合の相手はヘパリンではない別の分子であることが示唆された。この結果から、CcssB と CcssB K118N への結合性の差を利用した、サブトラクションによるレセプター検索が有効ではないかと考えている。

Subject No. : 24-110

Title : Development of Novel Preventive/Therapeutic Method against Cholera and Enterotoxigenic *E. coli* Infections.

Researchers : Takashi Hamabata, Tadashi Okamura, Kiyotaka Nishikawa

Key word : Bacterial diarrheagenic infection, Peptide neutralizer, CS6, Cellular invasion, Mouse infection model

Abstract :

(T. Hamabata)

#### 1) The mechanism of adherence of ETEC colonization factor CS6.

The CS6 gene of ETEC 3020 strain that adheres weakly to INT407 cells included 13 and 5 amino acid variations in C<sub>ss</sub>A and C<sub>ss</sub>B, respectively, compared to ETEC 4266 strain that adheres strongly to INT407. Based on these variations, a series of mutant CS6 was constructed and assessed the ability of adhesion, which revealed that C<sub>ss</sub>B, not C<sub>ss</sub>A, is responsible for the strong adhesion of 4266 and the 118<sup>th</sup> lysine in C<sub>ss</sub>B is a key amino acid for the adhesion. Also, the adhesion via CS6 was turned out to be mannose-resistant.

#### 2) The mechanism of cellular invasion via CS6.

The ETEC cellular invasion assay with several inhibitors of cellular signaling suggested that activation of PI3K-Akt and other tyrosine kinases, but not Src and PKC, are involved in this event to drive actin polymerization to engulf the bacteria. It was also suggested that the engulfed ETEC multiplied even in the late endosome. Analysis to see the significance of this CS6-dependent cellular invasion is underway using mouse in vivo and ex vivo experiments.

#### 3) Analysis on the regulation mechanism of CS6 gene.

In order to find the transcriptional regulator protein of CS6 gene, CS6 plasmid was isolated from previously constructed ETEC4266 *cssB*:Km (kanamycin-resistant cassette) isogenic strain. The entire nucleotide sequence of the plasmid was determined using a next-generation sequencer with the subsequent help of gap-filling PCR. The CS6 plasmid of 4222 was 165 kb in length and designated as pC<sub>ss</sub>165. This plasmid contains Insertion Sequences up to 24.4% and several genes that might function to be advantageous to itself. Although two known transcriptional regulators, *csvR* and *araC*, were found on pC<sub>ss</sub>165, knockout of these genes constructed from 4266 affected neither CS6 expression nor adhesion to INT407 cells. The regulator of CS6 was suggested to be located elsewhere in the genome of 4266.

#### 4) The assembly between C<sub>ss</sub>A and C<sub>ss</sub>B.

C<sub>ss</sub>A and C<sub>ss</sub>B are known to bind strongly each other with 3.2 pM in K<sub>d</sub>. Recent molecular analysis also reported that these subunits interact by N- with C- termini of the counterpart. To identify the functionally important amino acid residues, alanine-scanning mutagenesis was performed and the CS6-expression as well as cell adhesion assay was conducted. Several amino acids were suggested to be important to stabilize C<sub>ss</sub>A or C<sub>ss</sub>B itself, for association between these structural subunits, and also for interaction with the chaperone C<sub>ss</sub>C.

(K. Nishikawa)

Researchers には、分担研究者を記載する。

### 1) Effects of novel peptide-based neutralizers against Cholera toxin (CT) and heat labile enterotoxin (LT).

A series of amino acid mutant in the receptor-binding region of B-subunit of CT (CTB) and LT (LTB). One of the mutants from CTB, CTB-E51A, which showed decreased affinity to receptor GM1, was used for the subtraction of the peptide library screening and enabled to determine a CTB-binding motif. Subsequently, a tetravalent peptide compound (GGR-tet) was revealed to bind to CTB with E51-dependent manner and inhibit CHO cell elongation induced by CT specifically. However, GGR-tet did not inhibited cAMP overproduction of Caco-2 cells. We therefore developed novel peptide compounds YGR-tet and GNR-tet, by means of multivalent peptide on-sheet synthesis, which inhibit both CHO elongation and Caco-2 cAMP overproduction. Importantly, GNR-tet, which can inhibit the CT activities in vitro with more potency, could markedly inhibit the fluid accumulation in mouse ileal loop induced by CT treatment, indicating that GNR-tet can be a potential therapeutic agent against cholera.

The novel compounds AAR-tet for LT-inhibitor, developed through the same multivalent peptide library approach as CT, showed efficient inhibition on both CHO elongation and Caco-2 cAMP overproduction induced by LT. Subsequently, 2 novel tetravalent peptide neutralizers against LT, NNR-tet and ENR-tet, were obtained by using the multivalent peptide-sheet synthesis technology. These 2 neutralizers also effectively inhibited both the LT-induced morphological changes in CHO cells and the enhancement of cAMP production in Caco2 cells induced by LT. Interestingly, GGR-tet, which was originally identified as a CT neutralizer as mentioned above, was found to inhibit the enhancement of cAMP production most efficiently (69 % inhibition), clearly indicating that the best inhibitory motifs against CT and LT are different respectively despite the high homology between these two toxins. GGR-tet markedly inhibited the fluid accumulation in mouse ileal loop induced by LT treatment in a dose dependent manner.

### 2) Development of novel peptide-based neutralizers against heat-stable enterotoxin (ST).

We successfully prepared an amino-terminus deleted form of STh (5-18), which is produced by a human strain of enterotoxigenic *E. coli*, with a biological activity to enhance the cGMP production in Caco2 cells. For developing STh-neutralizer, the STh(5-18) peptide was biotinylated remaining the cGMP overproduction ability in Caco-2 cells. We next prepared a mutant STh, STh(5-18) A14G, which has an amino acid substitution of Ala14 to Gly and then lacks the biological activity. Using these SThs, the peptide-library sheet-screening is proceeding based on the potency to bind to STh but not the mutant to identify effective neutralizers against Sth,

(T. Okamura)

### 1) Screening of inbred mouse strains as the background of cholera/ETEC infection model.

To find the most appropriate mouse strain for infection, *Vibrio cholerae* O1 N16961 and ETEC 4266 strains were orally administered to 7 inbred strains and excreted bacteria in feces were examined daily. *V. cholerae* disappeared from the intestine within 2 days in most strains,

suggesting that the experiment should be performed again with a lower dose of bacteria. On the other hand, ETEC tended to stay longer in the intestine, especially DBA/2 which continued to excrete ETEC for 8 days and consequently regarded as the most preferable candidate for ETEC infection model. Moreover, one mouse each from AKR and Balb/c kept low level of excretion during the experiment, suggesting that these mice became carrier of ETEC. After checking the reproducibility of the above results with another experiment, we concluded that no specific strain was suitable for *V. cholera* infection host while DBA/2 was a candidate of ETEC infection model background among the popular inbred strains.

## 2) Analysis of the host receptor of ETEC colonization factor CS6.

Fibronectin and mucin have been suggested to be possible candidates of CS6 receptor. However, unexpectedly, RT-PCR of fibronectin and mucin 2 and 3A using RNA from ETEC-adhering INT407 and non-adhering Caco-2 cells showed a contradicted result that these RNAs were rather more abundant in Caco-2 than in INT407. To search other candidate for CS6 receptor, RNA array analysis was performed using INT407 and Caco-2 RNA. After confirming with RT-PCR, 7 genes related to extracellular matrix (ECM) were listed up for novel candidates of real CS6 receptor.

Besides, the binding preference of CS6 was examined using glycan array slides. It was found that CS6 preferentially bound to heparin, and the binding seemed depending on the number as well as the position of desulfurization in heparin molecule. CssB, the CS6-constitutive subunit together with CssA, showed the same result as CS6, whereas CssA showed weak binding to Lacto N-neotetraose (LNnT) as well as heparin. However, LNnT did not inhibit the adherence of ETEC4266 to INT407 cells, whereas heparin did in a dose-dependent manner. Taking into account the data we previously reported that 118<sup>th</sup> lysine (K118) in CssB is responsible for the adherence by CS6, we thought it was possible that the positive charge of CssB K118 and the negative charge of sulfate in heparin might be the mechanism of adherence by CS6. If in the case, to construct transgenic mouse infection model would be difficult because heparin is not a protein but a glycosaminoglycan. To confirm this, CssB(K118N) gene was constructed, and CS6(K118N) was purified and proceeded to glycan array. The result was similar to that of CssA that bound to heparin and LNnT. Further, we purified CssB(K118N) protein and examined its binding preference to glycans. The result similar to that of wild type CssB even reduced to 70% efficacy. Hence it was suggested that the strong binding of CS6 to heparin was a false positive simply attributed on the strong opposite charges between them, and real receptor of CS6 which recognizes the CssB K118 specifically is unidentified molecule other than those spotted on the glycan array slide. Subtraction between CssB and CssB K118N might be required to identify the real CS6 receptor.

## 背景

コレラと腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 感染症は、途上国の5歳以下の乳幼児を中心に合わせて年間患者10億人、死者100万人

➡ 予防・治療対策は急務である

2010年10月ハイチ大地震後の爆発的なコレラ大流行 (患者47万人、死者6,631人)

➡ ワクチンだけではこのようなアウトブレイクは抑えきれない



## 目的

従来のワクチンや抗生物質だけでは制圧の難しいコレラ・ETEC感染症に対する**新規の**予防・治療法の開発を目指した研究を行う

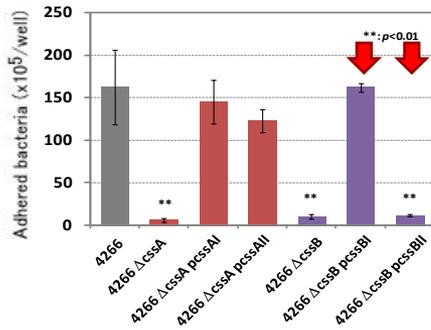
## 分担

- 腸管毒素原性大腸菌の付着因子CS6の解析と予防・治療への応用 (濱端)
- 合成オリゴマーペプチドを用いた毒素中和剤の開発 (西川)
- 細菌性下痢症の感染モデル動物の開発 (岡村)

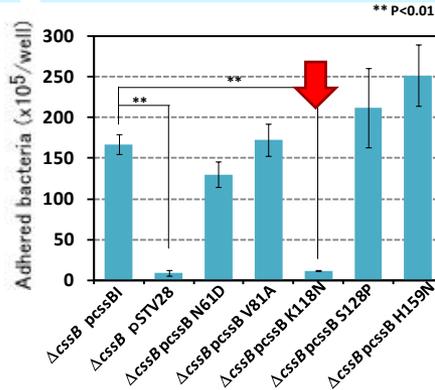
# 腸管毒素原性大腸菌の付着因子CS6の解析と予防・治療への応用(濱端)

## 1) ETEC付着因子CS6の付着メカニズムの解明

強付着CssAIBI型と弱付着CssAIIIBII型のキメラCS6の付着は、CssBI依存性的

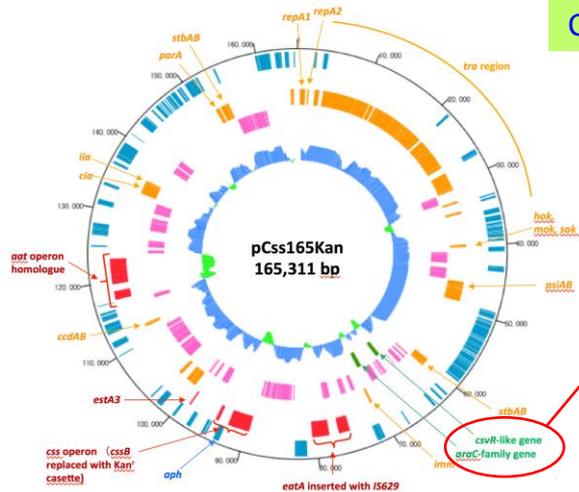


CssBI型にCssBII型のアミノ酸変異を入れると、K118Nのみ付着能を失う



CS6による付着の責任分子はCssBの118番目のリジン残基と決定

## 3) CS6遺伝子の発現調節メカニズムの解明



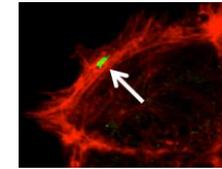
CS6プラスミドの全塩基配列を決定

プラスミドの保持に参与する多数の遺伝子があり、CS6保有ETECの選択に有利に働くことが示唆される

転写因子が2つ見つかったが、これらを欠損させてもCS6の発現・菌の付着は変化しなかった

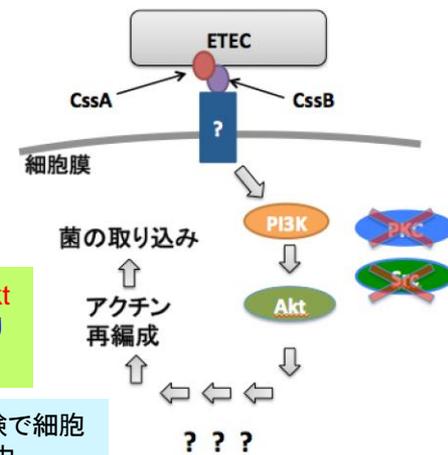
CS6遺伝子の転写調節因子はこのプラスミド外のゲノム中に存在すると思われる

## 2) CS6依存的な細胞侵入メカニズムの解明



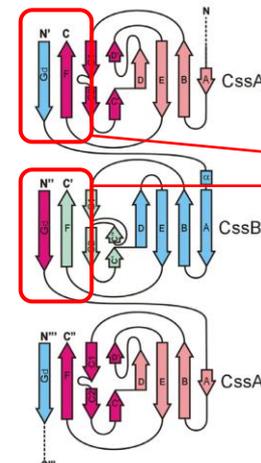
赤: アクチン  
緑: ETEC4266

CS6による細胞侵入はPI3K- Akt 経路を介したアクチン重合により起こる。PKCやSrcは無関係



In vivo, ex vivo 実験で細胞侵入の意義を検討中

## 4) CssAとCssBの結合メカニズムの解析



CssAとCssBはN末とC末が交互に強く結合している

この結合部分のアミノ酸を1残基ずつ Alanine に置換しCS6の発現と付着をスクリーニングした

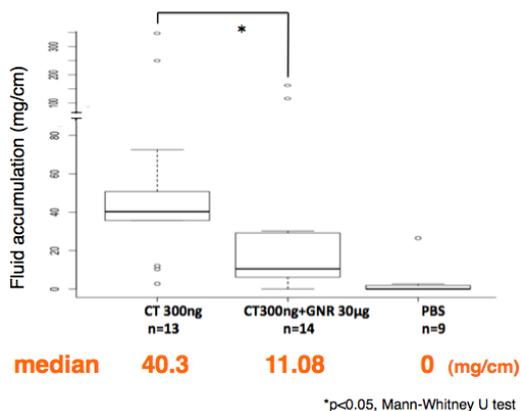
CssA-CssBの結合に重要なアミノ酸残基をCssAで3個、CssBで6個同定

シャペロンCssCとの相互作用に重要なアミノ酸残基をCssAで6個、CssBで3個同定

# 合成オリゴマーペプチドを用いた毒素中和剤の開発(西川)

## 1) CTならびにLTに対する新規ペプチド性阻害薬の開発

GNR-tetはマウス腸管ループのCTによる水分貯留を有意に阻害した



PBS

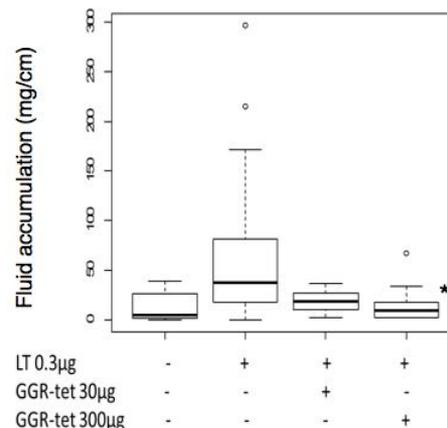


CT 300 ng/loop



CT 300 ng + GNR-tet 30 µg

GGR-tetはマウス腸管ループのLTによる水分貯留を有意に阻害した



PBS



LT 0.3 µg

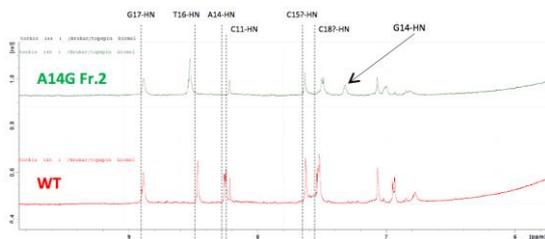


LT 0.3 µg + GGR-tet 300 µg

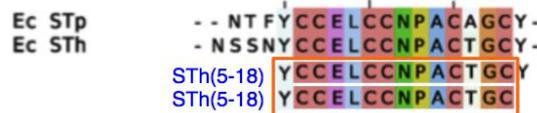
median 5.1 37.3 18.4 9.5 (mg/cm)

Wilcoxon rank sum test p < 0.05\* vs LT (0.3 µg)

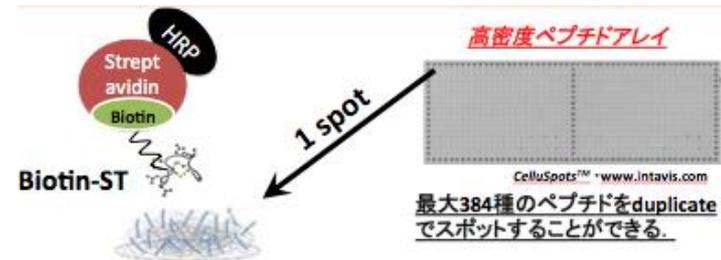
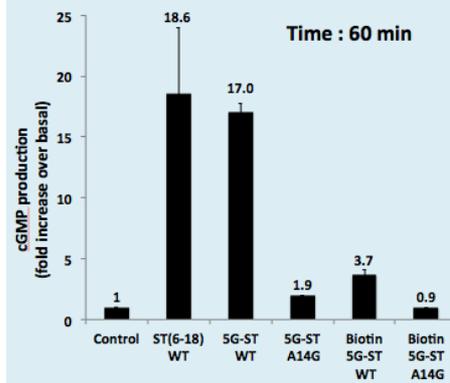
## 2) STh標識プローブの調製



STh(5-18)A14GのNMRスペクトル



## Biotin標識プローブの活性評価

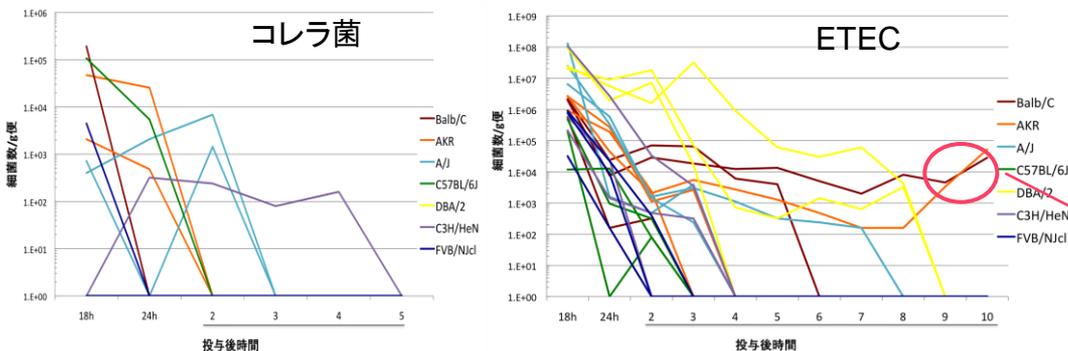


高密度ペプチドアレイを用いてSTh結合モチーフの同定を行う

受容体結合部位変異STh(5-18)A14Gの調製

# 細菌性下痢症の感染モデル動物の開発(岡村)

## 1) コレラ菌およびETEC易感染マウス系統の探索



10<sup>10</sup>個の菌を各種近交系マウスに経口投与し、半日後以降の便中の菌を測定。コレラ菌は速やかに排除されたが、ETECは排菌が長く、特にDBA/2(黄色)は再現性良く長期の排菌を示した。ETEC感染系のモデルとして好適と考えられる。

一部、低レベルでの排菌が続く個体あり。菌の細胞内侵入によるキャリア化か？

ETECの細胞侵入の実験系に使える可能性

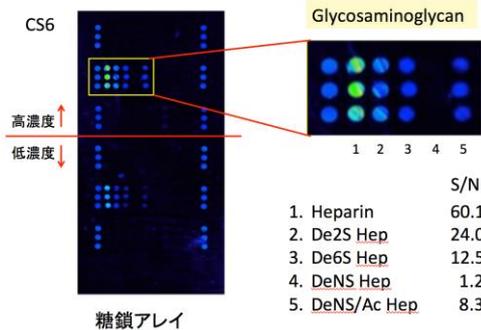
## 2) ETEC付着因子CS6の宿主レセプターの探索

ETEC高付着のINT-407  
ETEC低付着のCaco-2

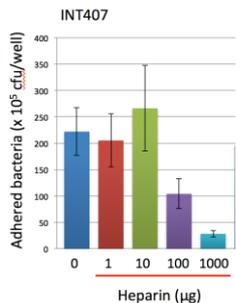
RNA arrayによりCaco-2  
で発現の多い細胞外マトリクス関連遺伝子を抽出

RT-PCRで確認し7遺伝子を絞り込む

糖鎖アレイにより糖鎖の情報を統合できれば

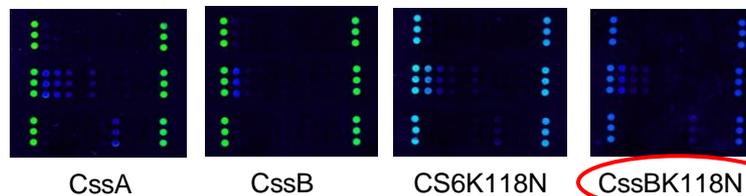


CS6はヘパリンのみに強く結合した



ヘパリンは量依存的にETEC4266のINT407への付着を阻害した

ヘパリンが真の宿主レセプターだとすると、トランスジェニックマウスの構築が困難であるので、その真偽を確認する必要がある



付着しないはずのCcssBK118Nでもまだヘパリンに結合性を示す

ヘパリンへの結合は電荷によるFalse Positive

CcssBとCcssBK118Nのサブトラクションによるレセプター検索の可能性を検討する

課題番号 : 24指110  
研究課題名 : 細菌性下痢症の感染モデルマウスの開発  
主任研究者名 : 濱端 崇  
分担研究者名 : 岡村匡史

キーワード : レセプター、トランスジェニックマウス、細菌感染マウスモデル、マウス感染評価系。  
研究成果 :

#### 1. 目的

コレラ菌および毒素原性大腸菌 ETEC の易感染モデルマウス構築に向け、コレラ菌及び ETEC が定着しやすい近交系マウスを選抜する。また ETEC 易感染トランスジェニックマウスに導入する ETEC 付着因子 CS6 の宿主側レセプター候補の特定を試みる。

#### 2. 研究成果

##### 1) 近交系マウスを用いたコレラ・ETEC 易感染マウスの選抜

近交系マウス Balb/c、B57BL/6、A/J、AKR、C3H/He、DBA/2、FVB の 7 系統にコレラ菌 N16961 株および ETEC4266 株を経口投与し排菌数を経時測定することにより腸管内に菌が滞留しやすい易感染系統を検索した。コレラ菌ではほぼ全系統で 2 日目までに排菌が終了した。ETEC では一部の系統で 4 日目以降も排菌が認められ、特に DBA/2 は高い排菌数を示し 3 匹中 2 匹で 8 日目まで排菌が継続した。また Balb/c と AKR は各 1 匹が 2 日目から測定を終了する 10 日目まで比較的低レベルの一定の排菌を示したことから、ETEC のキャリア化が示唆された。追試においても上記と同じ傾向が得られたため、コレラ菌については保留、また ETEC については DBA/2 を易感染マウスのバックグラウンド最有力候補と決定した。

##### 2) Caco-2 細胞に CS6 レセプター遺伝子を導入するためのトランスフェクションの条件検討

CS6 の宿主レセプターが同定されたら、当該遺伝子を ETEC4266 株低付着の Caco-2 細胞に形質導入し、付着が増加するかを確認する必要がある。しかし Caco-2 は腸管上皮細胞でトランスフェクション効率が極めて低い。そこで GFP をレポーターとして利用できる pIRES-AcGFP1 ベクターを Caco-2 細胞に形質転換する条件を検討した。エレクトロポレーションならびにリポフェクション法の各種試薬を検討した結果、24 穴プレートで Lipofectamine LTX™ (Clonetechnology 社) を使用し DNA を 1 µg 以上用いると最も効率よくトランスフェクションされ、さらに nupherin™ (ENZO 社) による前処理でも効率が上がった。しかし導入効率は推定 10% 程度程度に留まり、さらに改善が必要と考えられた。

##### 3) ETEC 付着因子 CS6 の宿主レセプターの探索

CS6 のレセプター候補であるフィブロネクチン、ならびにムチンのうち腸管での発現が多いことが報告されているムチン 2 および 3A 遺伝子の発現を ETEC 強付着の INT-407 および低付着の Caco-2 で RT-PCR により調べたところ、Caco-2 で明らかに多く、菌の付着量とは逆の結果となった。そこで他のレセプター候補を網羅的に探索するため、両細胞の RNA アレイを行い、INT-407 で Caco-2 よりも 5 倍以上発現量が多く、かつ細胞外マトリクスおよび付着関連遺伝子に限定して検索したところ、該当する遺伝子を 17 個見いだした。さらに RT-PCR により確認し、Caco-2 より INT-407 で発現の多いムチン 1、16、コラーゲン 5A1、8A1、24A1、ラミニン A1 およびインテグリン β8、以上 7 つを新たな候補として抽出した。しかしこれら全てについて siRNA によるノックダウン解析や INT-407 細胞でのノックアウト、Caco-2 細胞へのトランスフェクション等をするのは非効率的なので、他の多くの付着因子が糖鎖あるいは糖脂質糖鎖に結合することから、CS6 の糖結合性をアレイを使って解析し、その情報を元にレセプターを絞り込むことにした。

ETEC4266 より Ghosal ら (Infect Immun 77: 2125-2135, 2009) の手法に準じて CS6 を精製した。糖鎖固定化アレイおよび糖脂質糖鎖固定化アレイ (住友ベークライト) に精製 CS6 アプライし、ウサギ抗 CsaA および CsaB 抗体、および Cy3 標識ヤギ抗ウサギ IgG で蛍光を検出し解析した。その結果、CS6 はヘパリンとヘパリン脱硫酸化物に強く結合し、アレイにスポットされているその他の一般的な糖鎖・糖脂質糖鎖には全く結合しなかった。またヘパリンの脱硫酸化を反映して結合が若干弱まるが、脱硫酸化の位置によってその強度が異なることがわかった。

さらにCS6の構成サブユニットであるC<sub>ss</sub>AおよびC<sub>ss</sub>BをそれぞれHis融合タンパクとして発現し、Hisタグを除去して精製した。これらについてもそれぞれ糖鎖固定化アレイで解析したところ、C<sub>ss</sub>Bはヘパリンのみに結合したのに対し、C<sub>ss</sub>AはCS6と同様の強度でヘパリンとヘパリン脱硫酸化物に結合し、さらにLacto-N-neotetraose (LnNT)にも弱く結合した。この結果の有意性を確かめるためETEC 4266株の付着阻害実験を行ったところ、ヘパリンはETEC 4266株のINT407細胞への付着を量依存的に阻害したが、LnNTは全く阻害しなかった。CS6の結合を担うのはC<sub>ss</sub>Bの118番目のリジンであることから、CS6による付着はリジンの正電荷とヘパリン硫酸基の負電荷の結合である可能性が考えられた。ヘパリンはグリコサミノグリカンなので、ヘパリンが真のCS6宿主レセプターだとすると単一遺伝子の導入だけで易感染マウスを作製するのは困難である。そこでヘパリンが本当にCS6のレセプターであるのかを確認するため、C<sub>ss</sub>Bの118番目のKのみを弱付着型CS6サブタイプのアスパラギン(N)に変異させたCS6(C<sub>ss</sub>B K118N)遺伝子を実験室大腸菌株TOP10に導入し、この形質転換株からCS6(C<sub>ss</sub>B K118N)タンパクを精製し、糖鎖アレイ解析により糖鎖結合選択性の変化を調べた。その結果は、依然ヘパリンが陽性で、かつLnNTにも弱く結合が見られるという、C<sub>ss</sub>A単独の糖鎖結合プロフィールに酷似していた。すなわち、C<sub>ss</sub>Bのヘパリンへの結合が激減したため、C<sub>ss</sub>A単独の結合プロフィールに近づいたと考えられた。さらに前出の形質転換TOP10株からPCRでC<sub>ss</sub>B K118N遺伝子を単離し、新たに発現ベクターにリクローニングし、Hisタグによる抽出の後Hisタグを除去し精製した。この精製C<sub>ss</sub>B K118Nを用いて糖鎖アレイ解析を行った結果、ヘパリンとの結合性は減弱したものの、野生型C<sub>ss</sub>Bの70%程度残っていた。したがって、CS6はC<sub>ss</sub>A、C<sub>ss</sub>Bともに強く陽性に荷電しているため陰性に荷電しているヘパリンには強く結合するものの、C<sub>ss</sub>Bの118番目のリジンを責任アミノ酸とする特異的結合の相手はヘパリンではない別の分子であることが示唆された。この結果から、C<sub>ss</sub>BとC<sub>ss</sub>B K118Nへの結合性の差を利用した、サブトラクションによるレセプター検索が有効ではないかと考えている。

課題番号 : 24指110  
研究課題名 : 合成オリゴマーペプチドを用いた毒素中和剤の開発  
主任研究者名 : 濱端 崇  
分担研究者名 : 西川 喜代孝

キーワード : コレラ毒素 (CT)、易熱性エンテロトキシン (LT)、耐熱性エンテロトキシン (ST)、  
ペプチドライブラリー、阻害薬

研究成果 :

(目標)

1) CT、LT の受容体結合部位を標的とし、多価型ペプチドライブラリー法を用いて、高親和性結合能を有するペプチド性化合物を同定すること、さらに候補分子についてインビトロさらにはインビボでの阻害活性を評価し、新規阻害薬として確立すること、2) STh の完全合成法を確立し、その活性評価系を確立すること、さらに既知配列から構成されるペプチドライブラリーアレイを用いて STh に高親和性を示すペプチド性化合物を同定すること。

(成果)

#### 1) CT ならびに LT に対する新規ペプチド性阻害薬の効果

コレラ毒素 CT ならびに大腸菌易熱性毒素 LT は、B-サブユニット (CTB, LTB) を介して標的細胞表面の糖脂質 GM1 に結合する。そこで、CTB, LTB の受容体結合領域に種々のアミノ酸に変異を有する一連の変異体を調製した。CTB については、GM1 の末端 Gal 結合部位に変異を有する変異体 (CTB-E51A, CTB-K91A)、GM1 の末端シアル酸結合部位に変異を有する変異体 (CTB-E11A, CTB-Y12A, CTB-H13A) を作製し、CTB-E51A, CTB-E11A では GM1 との結合親和性が 1/3-1/5 に低下していること、CTB-Y12A では結合親和性は不変だが最大結合量が 25%低下していることを見出した。LTB についても同様の変異体を作製したが、CTB と異なり、LTB-E51A, LTB-E11A では GM1 との結合親和性は不変で最大結合量がそれぞれ 50 ならびに 30%低下していた。

変異体 CTB-E51A を用いて、多価型ペプチドライブラリーの 1 次、2 次、3 次スクリーニングを行い、CTB 結合モチーフを同定した。さらに ELISA 法にて、本モチーフを 4 個有する多価型ペプチド性化合物 (GGR-tet) が E51 依存的に CTB に結合することを見出した。また GGR-tet は、CT によって誘導される CHO 細胞の形態変化を特異的に抑制すること、一方 CTB 結合配列を持たない核構造のみの化合物 (MA-tet) では全く阻害能が認められないことから、GGR-tet は特異的に CTB に結合することにより CT 阻害能を発揮することがわかった (特願 2014-050828)。しかし GGR-tet は、CT の CHO 細胞形態変化誘導能を効率よく阻害するものの、ヒト結腸がん由来細胞株 Caco2 細胞での cAMP 産生増加能に対してはほとんど阻害効果を示さなかった。今回、GGR-tet の配列をベースとして多価型ペプチドシート合成技術を用いたスクリーニングを行うことにより、新規多価型ペプチド性化合物 (YGR-tet, GNR-tet) を開発した (特願 2014-050828)。YGR-tet ならびに GNR-tet は、CT の CHO 細胞形態変化誘導能、ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能、を共に効率よく阻害することが示された。

今回、マウス腸管ループを用い、CT により引き起こされる水分貯留に対する多価型ペプチド性化合物の効果を検討した。まず、マウス腸管ループでの系の確立を試みた。ICR マウス(♀、4-5 週令)を開腹し、胃下流から盲腸上部にかけて 3 cm 程度のループを 6 個 (部位 1-6) 作成し、各ループに CT あるいは PBS を投与したあと閉腹し、8 時間後の各ループの水分貯留量を定量した。まず、CT 500 ng の効果を検討したところ、部位によって感受性が異なること、その中でも部位 3, 4, 5 について顕著な水分貯留が認められることが分かった。そこで、CT の効果は 1 個体 1 処理で検討すること、使用ループは部位 3, 4 を用いることにした。本条件で、CT の容量依存的 (100-500 ng) な顕著な水分貯留が認められた。確立できた系を用い、CT (300 ng, n=13) 投与に対する GNR-tet (30 microgram, n=14) の効果を検討したところ、CT 単独による水分貯留を GNR-tet は顕著に抑制することを見出した。本結果はペプチド性化合物の vivo での効果を初めて示したものであり、コレラ治療薬として期待できる。

LT については、新規多価型ペプチド性化合物 (AAR-tet, NNR-tet, ENR-tet) を同定した (特願 2014-128632)。AAR-tet、NNR-tet ならびに ENR-tet はともに、CHO 細胞形態変化誘導能、ならびに Caco2 細胞での cAMP 産生増加能を効率よく阻害した。興味深いことに CT 阻害薬として同定した GGR-tet

は、CT による Caco2 細胞での cAMP 産生増加能をほとんど抑制しないにもかかわらず、LT による cAMP 産生増加能を強力に (69%阻害能) 阻害することが示された。以上の結果は、CT と LT は高いホモロジーを有するものの、各々に対する最適阻害モチーフは異なっており、各々に対して個別に阻害薬開発をすることが必要であること、またそれが可能であることを明瞭に示している。今回マウス腸管ループを用いて LT による水分貯留の系を確立した。確立できた系を用い、LT (300 ng, n=16) 投与に対する GGR-tet (300 microgram, n=10) の効果を検討したところ、LT 単独による水分貯留を GGR-tet は顕著に抑制することを見出した。

## 2) 高親和性 STh 結合ペプチドの同定

### 2-1) STh の精製と活性測定系の確立

STh は 19 アミノ酸から構成されるペプチドで、一分子中に 3 個の S-S 結合を有しており、大腸菌発現系での調製は困難である。そこでペプチド合成機により STh 最小活性部位から構成される STh (5-18) を合成し、空気酸化により S-S 結合を形成させ、逆相 HPLC を用いて高純度標品を精製した。

STh は内因性ペプチドであるグアニリンと同様に、細胞膜表面に存在しているグアニレートサイクラゼに結合し活性化することにより、細胞内の cGMP 濃度の増加を引き起こす。そこで、精製 STh (5-18) の活性を評価するため、Caco2 細胞を用いた cGMP 産生能を高感度に検出する系の確立を検討した。細胞由来 cGMP 産生の定量には PerkinElmer 社の AlphaLISA を用いた。Caco2 細胞は butyrate によって分化誘導するのではなく、22-25 日間培養することによりゆっくりと分化させた場合にグアニリンによる cGMP 産生応答性が獲得できることを確認した。この系を用いて Caco2 細胞を STh (5-18) で刺激したところ、容量依存的に cGMP 産生能が亢進することが確認できた。

### 2-2) ペプチドライブラリーアレイスクリーニングのための STh 標識プローブの調製

これまでに、Caco2 細胞での cGMP 産生能増加能力を保持したまま、高純度ビオチン化 STh (5-18) を調製することに成功している。今回スクリーニング時のサブトラクションに使用する、受容体結合部位に変異を有するビオチン化変異体 STh (5-18) A14G の調製を試みた。目的とする配列のペプチドを合成後、空気酸化により S-S 結合を形成させ、逆相 HPLC による精製を行った。その結果 2 本のメインピーク①、②が観察されたが、活性変異体であるため cGMP 産生能増加能力ではどちらが正しい立体配置を保持したものの判別が困難であった。そこで各分画後のサンプルについて NMR 解析を行ったところ、②にのみ野生型には存在しない、G14 に由来するプロトンのピークが観察された。このことから②が目的とする STh (5-18) A14G と判断し、ビオチン化を行い、プローブ化した。得られたビオチン化 WT-STh (5-18) ならびに STh (5-18) A14G を用いて、Caco2 細胞での cGMP 産生能増加能力を検討したところ、WT については未標識体に比べると活性は 1/5 に低下するものの十分な活性を保持していること、ビオチン化 STh (5-18) A14G は WT に比べるとさらに活性が 1/4 に低下することが示された。この結果から、スクリーニング時のサブトラクションに十分使用できるプローブが調製できたと判断した。現在、ペプチドライブラリーアレイをスライドガラス上に作製する技術の確立を進めており、作製でき次第今回作製したプローブを用いて部位特異的 ST 阻害モチーフの同定を推進する。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 24指110

研究課題名： コレラ及び腸管毒素原性大腸菌感染症に対する新規予防・治療法の開発

主任研究者名： 濱端 崇

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Entire sequence of the colonization factor coli surface antigen 6-encoding plasmid pCss165 from an enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> clinical isolate.	Wajima T, Sabui S, Kano S, Ramamurthy T, Chatterjee NS, Hamabata T.	Plasmid	70	2013
Two specific amino acid variations in colonization factor CS6 subtypes of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> results in differential binding and pathogenicity	Debnath A, Wajima T, Sabui S, Hamabata T, Ramamurthy T, Chatterjee NS.	Microbiology	161	2015
Identification of a wide range of motifs inhibitory to Shiga toxin by affinity-driven screening of customized divalent peptides synthesized on a membrane	Watanabe-Takahashi M, Kato M, Shimizu E, Nishikawa K.	Appl. Environ. Microbiol.	81	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Intestinal adherence of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> involves both the subunits of colonization factor CS6	Chatterjee NS, Sabui S, Wajima T, Ramamurthy T, Hamabata T	第34回内藤カンファレンス	札幌	2012年10月
Colonization factor CS6 of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> : Functional heterogeneity due to sequence variation among CS6 genes	Chatterjee NS, Sabui S, Debnath A, Wajima T, Hamabata T, Ramamurthy T	新興・再興感染症に関するアジア・アフリカ リサーチフォーラム	東京	2013年1月
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	山本 洋、西川喜代孝、高橋美帆、濱端 崇	第86回日本細菌学会総会	千葉	2013年3月
ETEC 4266株のCS6プラスミドpCss165の全塩基配列の解析	輪島丈明、濱端 崇	第87回日本細菌学会総会	東京	2014年3月
受容体結合部位を標的とした易熱性エンテロトキシン阻害薬の開発	谷川哲也、高橋美帆、山本洋、濱端 崇、西川喜代孝、高橋美帆、濱端 崇	第87回日本細菌学会総会	東京	2014年3月
志賀毒素耐性THP-1細胞クローンの単離と解析	服部隆行、高橋美帆、西川喜代孝、内藤幹彦	日本薬学会第134回年会	熊本	2014年3月
プロテアソーム阻害薬によるシガトキシン誘導性アポトーシスの抑制 (Inhibition of Stx-induced Apoptosis by Proteasome Inhibitor)	服部隆行、大岡伸通、内藤幹彦、西川喜代孝、高橋美帆	第18回日本がん分子標的治療学会学術集会	仙台	2014年6月
受容体結合部位特異的Stx阻害薬の組み合わせによる阻害効果の増強	高橋美帆、清水英子、加藤美帆子、西川喜代孝	第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会	京都	2014年7月

研究発表及び特許取得報告について

プロテアソーム阻害薬による志賀毒素誘導性細胞死の抑制	服部隆行、高橋美帆、大岡伸通、西川喜代孝、内藤幹彦	第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会	京都	2014年7月
新規小胞輸送阻害薬による志賀毒素の細胞死誘導活性の抑制	服部隆行、高橋美帆、椎名勇、大橋愛美、旦慎吾、西川喜代孝、内藤幹彦	日本薬学会第135回年会	神戸	2015年3月
AB5型細菌毒素に対する多価型ペプチド性阻害薬の開発	西川喜代孝	第88回日本細菌学会総会	岐阜	2015年3月
新規ペプチド性コレラ毒素阻害薬のin vivoでの効果	雲井香保里、高橋美帆、山本洋、濱端崇、西川喜代孝	第88回日本細菌学会総会	岐阜	2015年3月
耐熱性エンテロトキシンに対するペプチド性阻害薬開発	近江 純平、高橋 美帆、宮坂知宏、山崎 伸二、日高 雄二、枋尾 豪人、濱端 崇、西川喜代孝	第88回日本細菌学会総会	岐阜	2015年3月
異なった受容体結合部位を標的とするStx阻害薬の併用による相乗効果	高橋美帆、清水英子、加藤美帆子、西川喜代孝	第88回日本細菌学会総会	岐阜	2015年3月
新規小胞輸送阻害薬を用いた志賀毒素による細胞死の抑制	服部隆行、高橋美帆、椎名勇、大橋愛美、旦慎吾、西川喜代孝、内藤幹彦	第19回腸管出血性大腸菌感染症研究会	東京	2015年7月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
CT阻害4価ペプチド及びコレラ治療薬	特願2013-051032	西川喜代孝、高橋美帆、山本洋、濱端崇	2013年3月13日	日本国
CT阻害4価ペプチド及びコレラ治療薬	特願2014-050828 (特願2013-51032の国内優先権主張出願)	西川喜代孝、高橋美帆、山本洋、濱端崇	2014年3月13日	日本国
LT阻害4価ペプチドおよびETEC感染症治療薬	特願2014-128632	西川喜代孝、高橋美帆、谷川哲也	2014年6月23日	日本国

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。