

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K08786  
研究課題名(和文) 病原細菌がハイジャックするユビキチン修飾システム

研究課題名(英文) Bacteria Hijack host ubiquitin system

## 研究代表者

Kim Minsoo (Kim, Minsoo)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：50466835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質のユビキチン修飾系は発生や免疫系、さらには、がん・神経変性疾患など様々な生理機能や疾患に関与することがよく理解されている。しかし、本修飾系の細菌感染における意義は未解明な部分が多い。本研究では、構造生物学・生化学や感染病理学などの手法により、病原細菌の感染成立におけるユビキチン修飾系の役割を解明した。病原細菌の感染成立を担う分子メカニズムの理解し、また、その成果を基に、病原細菌の感染に対する新しい治療薬の開発基盤構築を目指す。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

人類は今も細菌感染症を克服していないことから、感染成立機構の理解は全く足りていないと言える。この状況において、構造生物学・感染病理学を含めた多様な手法により、細菌感染成立を担う分子メカニズムを解明し、感染生物学の発展に貢献する点が本研究の学術的な特色であり、予想される成果と意義である。これらの細菌感染症は近年、多剤耐性菌による感染症例が増加し、有効なワクチンもいまだ開発されていないため、新たな治療薬の開発が喫緊の課題である。病原細菌の感染戦略の分子機構を解明し、その知見に基づいた新規の細菌感染治療薬の開発の基礎を築くことで、感染症の克服という医学的・社会的な意義もある。

研究成果の概要(英文)：It is well understood that the protein ubiquitin modification system is involved in diseases development such as infectious diseases, cancer, and neurodegenerative diseases. However, the significance of ubiquitin system in bacterial infection remains largely unknown. In this study, we elucidated the role of the ubiquitin modification system in the pathogenic bacteria infection using structural, biochemical, and pathological approaches. We found that ubiquitin is modified under the bacterial infection and modulated host immune signaling. Based on our results, we will plan to develop new therapeutic tools against pathogenic bacteria infection.

研究分野：分子生物学

キーワード：細菌感染 ユビキチン エフェクター

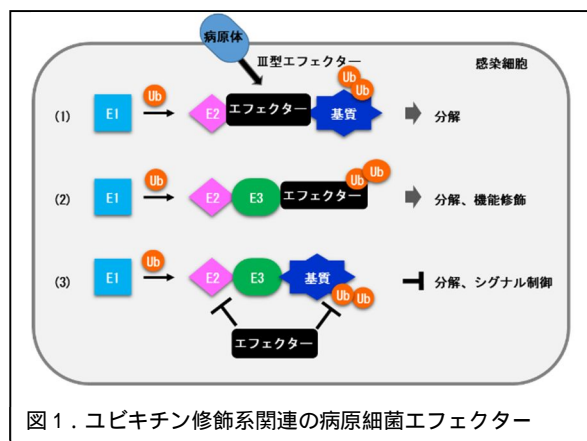
## 1. 研究開始当初の背景

多くの抗生物質が得られた現代においても、細菌感染症は人類の重大な脅威である。病原性大腸菌や赤痢菌などの腸管病原細菌による感染疾患は、開発途上国を中心に毎年 200 万の人命を犠牲にし、先進国でも被害を出している。これらの腸管病原細菌は近年、多剤耐性菌が増え、既存の抗生物質とは作用機序が異なる、新たなコンセプトの治療薬の開発が求められている。

腸管病原細菌の多くは、食物などにより口から侵入し、腸管の粘膜上皮細胞に感染する。ヒトなどの宿主は感染を受けた上皮細胞の除去や炎症反応などの「病原体に対する生体防御システム」を発動することで、病原細菌の定着を防いでいる。これに対し、腸管病原細菌は感染戦略の 1 つとしてタイプ III 分泌装置により一群の病原因子（エフェクター）を宿主細胞に分泌し、個々のエフェクターが作用する宿主因子を巧みに利用して細胞骨格や細胞周期、免疫応答などを制御することで、宿主の防御システムを無効化し、感染を成立させている。本申請者は、エフェクターが感染成立に果たす役割を同定することにより、細菌感染の分子メカニズムを解明してきた(*Cell Host and Microbe*, 8: 20-35)。

ユビキチン修飾系はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン連結酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の連鎖的な酵素反応により、E3 が認識する標的蛋白質のリジン残基にユビキチンを共有結合させる翻訳後修飾系である(*Trends in biochemical sciences*, 42:873-886)。多くの場合、ユビキチンにさらにユビキチンが連鎖的に重合され、ポリユビキチン鎖が形成される。ユビキチン化された蛋白質はプロテアソームにより分解されることが多いものの、ユビキチン化は分解以外にも多様な様式で蛋白質機能を制御することが近年解明されている。ユビキチン修飾系は発生や免疫系機能などの生理機能、また、がんや神経変性疾患といった種々の疾患に関わることがよく知られているが、細菌感染における役割は不明であった。しかし、近年、申請者らは、宿主細胞のユビキチン修飾系を制御することで感染成立に必要な細胞応答を引き起こす病原細菌のエフェクターを見出し、他のグループからもそのようなエフェクターが報告され始めた(*Cells*, 3:848-864)。これらのエフェクターは (1) ユビキチン修飾系の酵素活性を持つ分子、(2) 宿主細胞内でユビキチン化される基質分子、(3) 宿主のユビキチン修飾系の制御分子に大別できる (図 1)。し

かしながら、これら、ユビキチン修飾系関連のエフェクターの感染における役割やその作用機序は殆ど理解されていない。その上、ユビキチン修飾系の細胞・生体機能制御における重要性を鑑みれば、今後もユビキチン修飾系に関連するエフェクターが多く同定されることが想定される。



## 2. 研究の目的

病原細菌感染におけるユビキチン修飾系の役割の解明を目指し、(1) ユビキチン修飾系に関連する新規エフェクターの機能解析及び (2) 細菌感染時の宿主細胞応答の解明、これらの 2 点の

中心に解析を行った。これらを明らかにすることで、病原細菌の感染成立を担う分子メカニズムの理解に貢献し、また、その成果を基に、病原細菌の感染に対する新しいコンセプトの治療薬の開発の基盤とする。

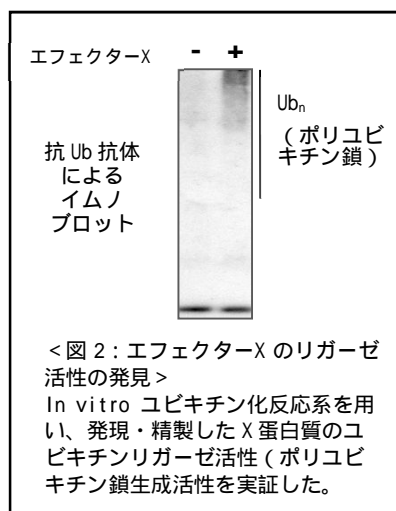
### 3. 研究の方法

本研究では、上記(1)、(2)について、分子生物学・生化学的・病態生理学・微生物学手法を用いて、上記の研究課題に取り組んだ。さらに、出芽酵母をモデル生物とした遺伝子改変細胞を作製し、先端質量分析方法を取り入れた解析を行った。さらに、構造解析法、超解像イメージング技術を駆使した解析も取り組んだ。

### 4. 研究成果

#### (1) ユビキチン修飾系に関連するエフェクター Xの機能解析：

申請者らは機能未知のエフェクター X の機能解析を行い、ユビキチンリガーゼ活性があることを見出した。エフェクター X の精製蛋白質を用いて、*in vitro*でのユビキチン化活性を証明した(図2)。エフェクター X と協役するユビキチン連結酵素 (E2) の特異性や形成されるポリユビキチン鎖の実体は不明であった。E2 蛋白質(10種類)を用いて、*in vitro* ユビキチン化反応を行い、X と協役するユビキチン連結酵素を同定した。同定した E2 酵素を用いて、ユビキチン鎖の重合様式を調べた。その結果、48 番目のリジン残基を介するポリユビキチン鎖を作るユビキチンリガーゼであることが明らかになった。細菌のユビキチンリガーゼは哺乳動物のリガーゼとは異なりリガーゼドメインを持つことが知られている。エフェクター X は 1次配



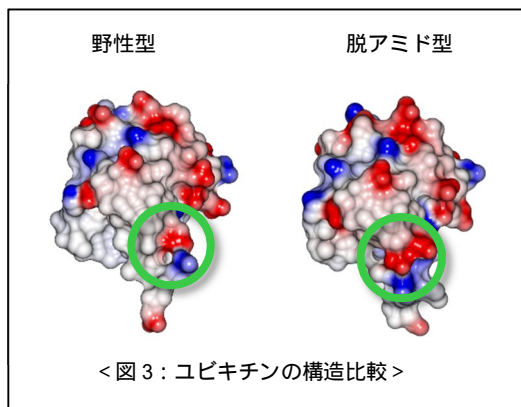
列上、他のユビキチンリガーゼとは相同性が見られなかった。ユビキチンリガーゼドメインの分子機構を明らかにするために、立体構造解析を試みた。エフェクター X の大腸菌発現系及び精製系を構築した。得られた精製蛋白質を用いて、エフェクター単独での結晶化を試みたが、結晶化には至らなかった。蛋白質の発現系及び結晶化条件の検討を行っている。立体構造が明らかになると新しいタイプのリガーゼドメインの分子機構が明らかになると期待される。これらの結果からエフェクター X はユビキチンリガーゼを持ち、炎症反応に関わると考えられ、その宿主標的タンパク質の同定が期待される。

#### (2) 病原細菌感染における宿主細胞応答

##### (2-1) ユビキチンの翻訳後修飾による感染細胞内のシグナル伝達の異常について解析を行った。

その過程で、我々は、腸管病原性大腸菌の感染細胞において、ユビキチンが翻訳後修飾(脱アミド化)を受けることを見出した。近年、翻訳後修飾因子であるユビキチンそのものが翻訳後修飾(リン酸化)を受け、そのリン酸化がミトコンドリアの品質管理に重要であることが判明した。その後、ユビキチンのアセチル化やリボシル化の役割も解明されているが、本研究対象であるユビキチンの脱アミド化の意義は殆ど不明である。本研究では、腸管病原性大腸菌感染細胞において、翻訳後修飾(脱アミド化)を受けたユビキチンの蓄積が宿主細胞のユビキチン修飾系にどの

ように影響し、細菌感染の成立に寄与するかを解析した。まず、脱アミド化を受けた機能解明のために、X-線結晶解析を用いて脱アミド化型コピキチンの構造を決定したが、野性型と大きな差は見られなかった (図3)。脱アミド化を受けたコピキチンの機能を明らかにするために、脱コピキチン化型コピキチンを発現する酵母株を作製し、脱コピキチン化による細胞内コピキチン修飾系の異常を調べた。酵母の中で発現している4種類のコピキチンをすべて脱アミド型コピキチンに置



換した酵母株を樹立した。脱アミド型コピキチンを発現する酵母株の増殖には影響がなかった。次に細胞抽出液から各コピキチン鎖の量を質量分析方法で定量した。その結果、K29 鎖が脱アミド化で有意に減少していた。他のコピキチン鎖に関しては、堅調な変化はみられなかった。細菌感染において重要なコピキチンリガーゼが形成するコピキチン鎖を調べた結果、コピキチン差の形成能には差がなかった。しかし、脱アミド化型コピキチン鎖はコピキチン結合蛋白質との結合能に異常があることを見出した。この結果、感染応答に重要なシグナル経路が活性化されず、感染拡大につながると考えられる。

(2-2) 感染防御における直鎖状コピキチン鎖の役割を調べ、直鎖状コピキチン鎖形成が亢進した細胞では、サルモネラ菌の周囲に直鎖状コピキチン鎖が過剰に集まることを超解像イメージング方法で、観察した。さらに、NF- $\kappa$ B シグナルの活性化が促進され、サルモネラ菌の除菌活性が亢進していることを発表した。

(2-3) 細菌自身、あるいは、細菌の病原性毒素をラットの小脳に投与すると、ミクログリアが活性化され、うつ病様の行動異常が惹起されることを発表した。

<http://research.kyoto-u.ac.jp/research/>

(2-4) 赤痢菌のコピキチンリガーゼ (IpaH) の X-線構造解析を行い、構造を決定した。決定した構造を基に、基質との結合に関与するアミノ酸残基をいくつか同定した。同定した結合に関与するアミノ酸をアラニンに変異した変異体を作成し、基質との結合及び炎症反応を調べた。その結果、基質との結合に重要な残基を発見した(連携研究者との共同研究)。

(3) その他：一般市民、産業界、中高生などを対象に「最新の創薬技術」や「細菌感染症と感染防御策」について紹介を行った。詳細はその他に後述する。新しい共同研究の成果として、もやもや病の原因遺伝子の RNF213 のコピキチンリガーゼ活性とその病態関連解析を行い、もやもや病の原因になる変異の一部が、コピキチンリガーゼ活性に関係することを発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto M, Kim M, Imai H, Itakura Y, Ohtsuki G	4. 巻 28
2. 論文標題 Microglia-triggered plasticity of intrinsic excitability modulates psychomotor behaviors in acute cerebellar inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 2923-2938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.07.078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeda M, Tezuka T, Kim M, Choi J, Oichi Y, Kobayashi H, Harada K, Mizushima T, Taketani S, Koizumi A, Youssefian S	4. 巻 525
2. 論文標題 Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NFκB activation and apoptosis in an AAA+domain-dependent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 668-674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 西出旭、Kim Minsoo	4. 巻 92
2. 論文標題 病原細菌によるユビキチン修飾系攪乱の分子機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 75-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920075	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高木賢治、西出旭、水島恒裕、Kim Minsoo
2. 発表標題 ユビキチン修飾システムの相互作用基盤解析
3. 学会等名 第14回日本ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takagi K, Nishide A, Inoue J, Iwai K, Mizushima T, Kim Minsoo
2. 発表標題 Post-translational modification of Ubc13 during bacterial infection
3. 学会等名 EMBO workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kim Minsoo
2. 発表標題 Regulation of host homeostasis by pathogenic bacterial ubiquitin ligases
3. 学会等名 JCUP- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kim Minsoo、高木賢治、水島恒裕
2. 発表標題 ユビキチン修飾システムの相互作用基盤解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤里紗、西出旭、永井明日香、Kim Minsoo
2. 発表標題 ユビキチンの翻訳後修飾解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西出旭、水島恒裕、Kim Minsoo
2. 発表標題 脱アミド化型ユビキチンの構造解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>一般市民、産業界を対象とした活動</p> <p>1. バイオインダストリー協会、2019年7月23日 ：「未来へのバイオ技術勉強会」にて最新の創薬技術について、主にバイオ・製薬企業などを対象として研究紹介を行った。 <a href="https://www.jba.or.jp/jba/seminar/se_02/inai.php">https://www.jba.or.jp/jba/seminar/se_02/inai.php</a></p> <p>2. 京都大学アカデミックデイ2019 ：細菌感染症と感染防御策について一般市民や中高生などを対象として研究紹介を行った。 「細菌と戦う私達のボディー」 日 時：2019年9月15日 場 所：京都大学吉田キャンパス 百周年時計台記念館 <a href="http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2019/16/">http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2019/16/</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	水島 恒裕  (Mizushima Tsunehiro)  (90362269)	兵庫県立大学・生命理学研究科・教授    (24506)	