

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02732

研究課題名(和文) 病原性レプトスピラによる細胞間接着装置の破壊戦略の解明

研究課題名(英文) Elucidating *Leptospira interrogans* strategies to disassemble the junctional complex

研究代表者

Toma Claudia (TOMA, Claudia)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40325832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：レプトスピラは皮膚や粘膜などから血流に入り、上皮バリアを破綻することによって全身へと広がる。上皮バリアの維持には、細胞間接着装置の正常な働きと細胞構造を保持するF-アクチン骨格が重要である。我々は、レプトスピラは細胞間接着装置の膜蛋白質であるE-cadherinの細胞内取り込みとF-アクチン骨格の変形を誘導することを明らかにしてきた。本研究では、レプトスピラで感染した上皮細胞では、E-cadherinの細胞内裏打ちタンパク質(p0071とp120カテニン)が減少することを明らかにした。さらに、その過程では宿主細胞のタンパク質分解系であるプロテアソームとリソソームが利用されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でレプトスピラは宿主真核細胞のタンパク質分解系をハイジャックすることによって、p0071とp120-カテニンを分解し、細胞間接着装置が破壊されることを明らかにした。本研究で得られた新規知見は、レプトスピラ症の病態形成メカニズムの理解に寄与し、本感染症を制御するためには、複数の経路が抑制可能であることがわかった。レプトスピラがどのように宿主真核細胞のタンパク質分解系を利用するかを明らかになることによって、必須細菌因子や細胞内伝達経路を阻止し、レプトスピラ症を制御できる新たな治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)： *Leptospira interrogans* disseminates hematogenously to reach the target organs by disrupting the epithelial apical junctional complex (AJC). E-cadherin is a transmembrane protein of the AJCs and is critical for maintaining AJC organization and epithelial tissue barrier function. We have reported that *L. interrogans* induces E-cadherin endocytosis and cytoskeletal rearrangement during AJC disassembly. In this study, we combine proteomic and imaging analysis with chemical inhibition studies to demonstrate that disrupting the AJCs of epithelial cells involves the degradation of E-cadherin scaffolding proteins, p0071 and p120-catenin. The degradation of these proteins is achieved by co-opting the lysosomal and the ubiquitin proteasome system of the host cell. The degradation of p0071 and p120-catenin induced the decreased E-cadherin membrane localization, thus, this strategy may allow *L. interrogans* to disassemble AJCs and disseminate through the body efficiently.

研究分野：病原細菌学

キーワード：レプトスピラ 尿管上皮細胞 細胞間接着装置

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症の病原体レプトスピラは、皮膚・粘膜から血流に入り、細胞間接着装置を破壊することによって全身へと広がる。細胞間接着装置 (apical junctional complex, AJC) は、上皮細胞シートのバリアとして働き、シグナル伝達や臓器機能の維持にも重要である。AJC は、E-cadherin を中心分子とする Adherens Junction (AJ) と Tight Junction (TJ) から構成され、細胞質側には細胞膜と平行に走行するアクチン束が集まっている。

申請者は、マウス感染実験にて、腎臓にたどり着いたレプトスピラは、近位尿細管の基底側から細胞間隙を通過しながら管腔側へと移行し、尿細管内で増殖・微絨毛の消失を誘導することを明らかにした (Yamaguchi *et al.*, 2018)。そこで、初代細胞のように高密度な微絨毛を保持する近位尿細管上皮細胞 (renal proximal tubular cells, RPTEC/TERT1) の実験系を立ち上げ、本菌と RPTEC の相互作用の研究を開始した。その結果、レプトスピラは病原性に関わらず E-cadherin の細胞外ドメインを切断することが分かった。しかし、病原性を有するレプトスピラは、E-cadherin の細胞内輸送を促進させることによって AJC を破壊することを見出した (Sebastian *et al.*, 2021)。

2. 研究の目的

レプトスピラによる AJC の破壊がどのような分子やシグナルを介して行われているかを明らかにし、レプトスピラの標的臓器への移行を遮断するための新たな治療法への分子基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

病原性レプトスピラとしては、*Leptospira interrogans* 血清型 Manilae UP-MMC-NIID 株、非病原性レプトスピラとしては、*L. biflexa* Patoc1 株を使用した。ヒト RPTEC として、ATCC の CRL-4031 細胞を Transwell にて 14 日間培養し、基底膜側から *L. interrogans* または *L. biflexa* で感染させた。感染 4 時間後と 24 時間後の感染細胞を回収し、プロテオーム解析によって *L. interrogans* の感染によって減少するタンパク質を同定した。

AJC 破壊の評価は：1) 経上皮抵抗値 (TEER) の測定、2) AJC の構成タンパク質 (E-cadherin, p0071, p120-カテニンなど) の局在変化を蛍光免疫染色や Western Blot にて解析、3) 細胞骨格の構造は Rhodamine-Phalloidin 染色および 3 次元電子顕微鏡 (FIB/SEM) による超微細構造変化を精査した、4) 各阻害剤を用いた感染実験にて *L. interrogans* による AJC 破壊の阻止を検討した。

4. 研究成果

プロテオームと Western Blot 解析により、E-cadherin を細胞膜に局在させるために必要なタンパク質 (p0071 と p120-カテニン) が感染 24 時間後には分解されていることを明らかにした (図 1 A)。また、蛍光免疫染色によって感染細胞では、p0071 と p120-カテニンの細胞膜局在が低下していることが分かった (図 1 B)。

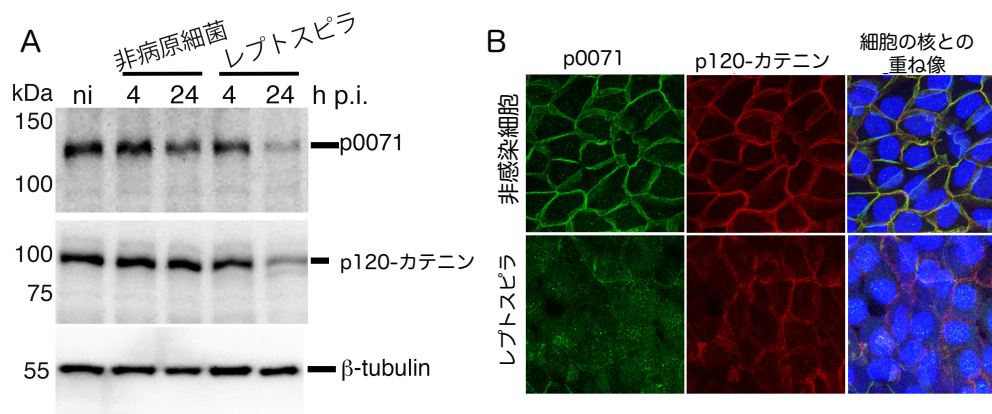


図1. (A) Western Blot: レプトスピラで感染したRPTECではp0071とp120-カテニンのタンパク質量が感染後24時間で減少している。(B) 蛍光免疫染色の像：p0071とp120-カテニンは感染細胞では接着装置に存在しない。Tokumon *et al.*, 2023より改編。

次に、リソソームのマーカである LAMP1 と AJC の裏打ちタンパク質 p0071 の多重免疫染色により、AJC から遊離した p0071 はリソソームに移行していることが判明したため、レプトスピラはリソソームを利用することによって p0071 と p120-カテニンを分解するという仮説をたてた。しかしながら、リソソームを阻害する実験ではタンパク質の分解は阻止されなかった。そこで、真核細胞でタンパク質を分解する経路「ユビキチン・プロテアソーム系、Ubiquitin Proteasome System, UPS」で分解されていると考えた。

リソソームと UPS を阻害するために RPTEC を BafilomycinA (BF) と MG132 (MG) で 30 分処理し、感染実験を行った。その結果、p120-カテニンの分解を抑制することに成功したが、p0071 の分解は阻止できなかった。蛍光免疫染色により、p120-カテニンが AJC に止まるため E-cadherin が細胞内に取り込まれず、F-actin 骨格は正常に保たれることが明らかになった。さらに、FIB-SEM トモグラフィ法にて阻害剤の組み合わせで RPTEC 同士の接着が保たれ、細胞層が壊れないまま細胞層が維持されていることが明らかになった(図 2)。このことは、E-cadherin の細胞膜局在には p0071 は必須ではないことを示唆した。

一方、p0071 の分解には Z-VAD-FMK 阻害剤で阻止されるプロテアーゼが関与していることが明らかになった。この結果から、レプトスピラは複数の経路で E-cadherin の裏打ちタンパク質を分解することによって、効率よく AJC を破壊することが明らかになった(図 3)。

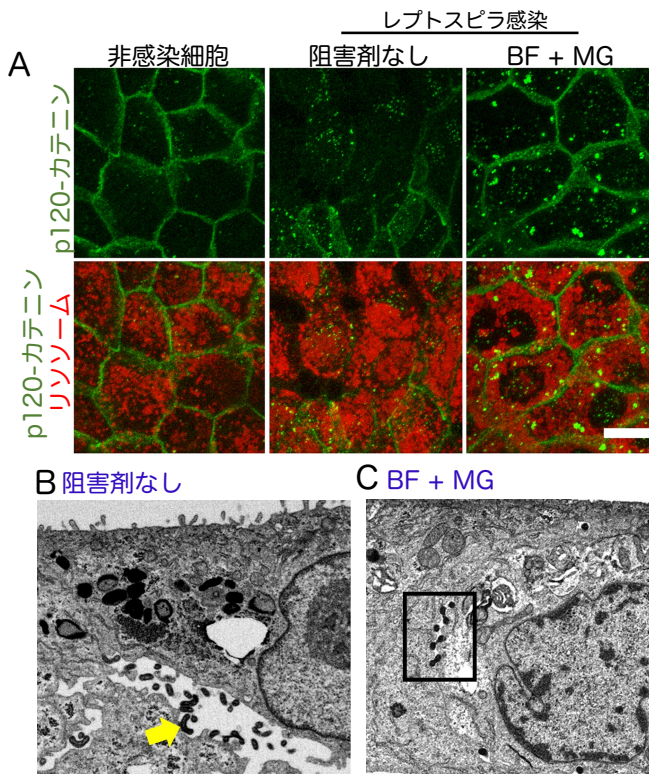


図2. リソソームとUPS阻害剤の組み合わせの効果。A: 蛍光免疫染色の像：接着装置に局在するp120-カテニンがレプトスピラの感染によって分解されるが、阻害剤はその分解を抑制する。BとC: FIB/SEMの像。B: レプトスピラが接着装置を破壊し、細胞同士が引き剥がされたため広い細胞間隙に多数のレプトスピラが観察された(矢印)。C: 阻害剤は接着装置の破壊を阻止し、レプトスピラは狭い細胞間隙に止まっていた(四角)。Tokumon et al. より改編。

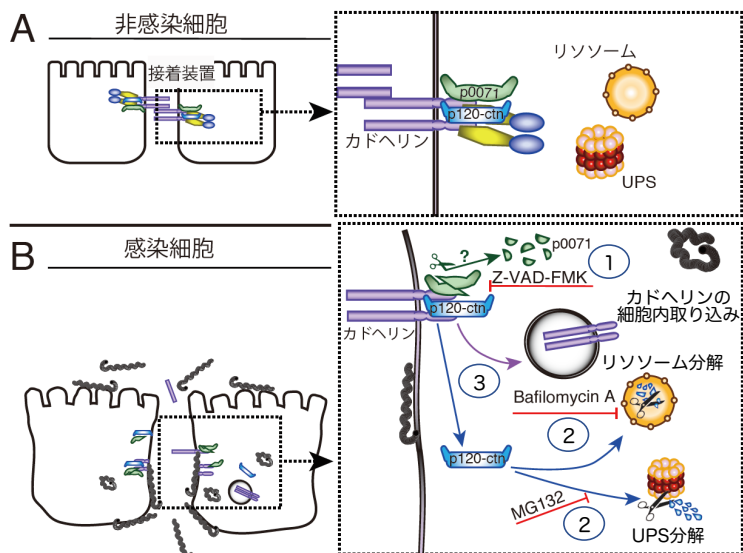


図3. A: 非感染細胞の接着装置の構造。p0071とp120-カテニン(p120-ctn)は、カドヘリンが細胞膜に局在するために必要な裏打ちタンパク質。B: 感染細胞ではレプトスピラがp0071とp120-カテニンを複数の経路で分解する。1) p0071の分解は、Z-VAD-FMKで抑制される。2) p120-カテニンの分解は、BafilomycinAとMG132の組み合わせで抑制される。3) カドヘリンが細胞内に取り込まれる。Tokumon et al., より改編。

参考論文：

Yamaguchi T, *et al.* Characterizing interactions of *Leptospira interrogans* with proximal renal tubule epithelial cells. *BMC Microbiology*, 2018; 18 (1): 64. doi: 10.1186/s12866-018-1206-8.

Sebastián I, *et al.* Disassembly of the apical junctional complex during transmigration of *Leptospira interrogans* across polarized renal proximal tubule epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 2021; 23: e13343. <https://doi.org/10.1111/cmi.13343>.

Tokumon R, *et al.* Degradation of p0071 and p120-catenin during adherens junction disassembly by *Leptospira interrogans*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023; doi:10.3389/fcimb.2023.1228051.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sato Yukuto, Hermawan Idam, Kakita Tetsuya, Okano Sho, Imai Hideyuki, Nagai Hiroto, Kimura Ryosuke, Yamashiro Tetsu, Kajita Tadashi, Toma Claudia	4. 巻 16
2. 論文標題 Analysis of human clinical and environmental <i>Leptospira</i> to elucidate the eco-epidemiology of leptospirosis in Yaeyama, subtropical Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0010234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0010234	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 Sebastian Isabel, Okura Nobuhiko, Humbel Bruno M., Xu Jun, Hermawan Idam, Matsuura Chiaki, Hall Malgorzata, Takayama Chitoshi, Yamashiro Tetsu, Nakamura Shuichi, Toma Claudia	4. 巻 23
2. 論文標題 Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of <i>Leptospira interrogans</i> across polarized renal proximal tubule epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.13343	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 Tokumon Romina, Sebastian Isabel, Humbel Bruno M., Okura Nobuhiko, Yamanaka Hidenori, Yamashiro Tetsu, Toma Claudia	4. 巻 13
2. 論文標題 Degradation of p0071 and p120-catenin during adherens junction disassembly by <i>Leptospira interrogans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1228051
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2023.1228051	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tokumon R., Oonishi M., Sebastian I., Yamashiro T., & Toma C.
2. 発表標題 Elucidating <i>Leptospira interrogans</i> strategies to disassemble the junctional complex.
3. 学会等名 58th Annual Meeting of the Japanese Leptospirosis Research Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tokumon R, Sebastian I, Yamashiro T, & Toma C.
2. 発表標題 Leptospira interrogans strategies for Junctional Complex disassembling.
3. 学会等名 Kyushu Microbial Research Forum 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tokumon R., Sebastian I, Yamashiro T., & Toma C.
2. 発表標題 Degradation of p120-catenin proteins during leptospiral disruption of the junctional complex
3. 学会等名 96th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Romina Tokumon, Isabel Sebastian, Yuta Hashimoto, Tetsu Yamashiro, Claudia Toma
2. 発表標題 Leptospira interrogans induces decrease of proteins involved in junction stabilization
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 トクモン・ロミナ、セバスティアン・イサベル、ホンベル・ブルーノ、大倉 信彦、山城 哲、トーマ・クラウディア
2. 発表標題 レプトスピラによる宿主細胞の蛋白質分解系のハイジャック
3. 学会等名 第59回レプトスピラ・シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

世界遺産・西表島における「レプトスピラ症」の病原体を 土壌培養と環境DNAから総合分析
<https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/32817/>
病原細菌が臓器を壊して感染する仕組みを解明～レプトスピラ症の新しい予防・治療法開発に期待～
<https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/22330/>

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
研究協力者	ホンベル ブルーノ (Humbel Bruno M.)		
研究協力者	大倉 信彦 (Okura Nobuhiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------