

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度 ～ 2011 年度

課題番号：22790403

研究課題名（和文）

新規赤痢菌 III 型分泌タンパクによる NF- κ B 活性化の抑制機構の解明

研究課題名（英文）

A bacterial effector deamidates Ubc13 to dampen the inflammatory response

研究代表者

真田 貴人（ Sanada Takahito ）

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：00569957

研究成果の概要（和文）：

我々は機能未知の III 型分泌エフェクタータンパク質である OspI に着目し、その赤痢菌感染における役割、構造解析に基づくタンパク質の機能予測および活性中心の同定、宿主側の標的分子の同定、分子レベルでの作用機序の解明を行った。その結果、感染初期の病原体に対する粘膜上皮の新規な防御機構と、それに対抗する病原体側のあらたな戦術を明らかにした

研究成果の概要（英文）：

We show that OspI, a *Shigella* effector encoded by *ORF169b* on the large plasmid and delivered via the type III secretion system (T3SS), dampens acute inflammatory responses during bacterial invasion by suppressing the TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)-mediated signaling pathway. OspI is a glutamine deamidase that selectively deamidates Gln100 to Glu100 in Ubc13. Consequently, the E2 ubiquitin-conjugating activity required for TRAF6 activation is inhibited, allowing *Shigella* OspI to modulate the diacylglycerol-CBM (CARD-Bcl10-Malt1) complex-TRAF6-NF- κ B signaling pathway. We determined the 2.0 Å crystal structure of OspI, which contains a putative Cys-His-Asp catalytic triad. A mutational analysis showed this catalytic triad to be essential for the deamidation of Ubc13. Our results suggest that *Shigella* inhibits acute inflammatory responses in the initial stage of infection by targeting the Ubc13-TRAF6 complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細菌学（含真菌学）

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性大腸菌/ *Shigella flexneri*/ T3SS/ 自然免疫/ 脱アミド化/ TRAF6/ NF- κ B/ Ubc13

1. 研究開始当初の背景

病原微生物と宿主の攻防の中で、病原体に対する宿主防御機構の一つとして自然免疫が挙げられる。自然免疫応答は、病原体が腸管上皮細胞へ侵入・定着する過程で、炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を誘導し、病原体を排除する感染初期の生体防御機構である。しかしながら、病原微生物は、様々な戦略によって宿主免疫応答を回避することが知られている。赤痢菌は、III型分泌装置と呼ばれるタンパク質分泌装置によって、腸上皮細胞へエフェクタータンパク質を分泌し、炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を抑制する。これまでに宿主免疫応答を抑制する赤痢菌 III型分泌エフェクターとして IpaH9.8、OspF、OspG、OspZ が報告されている。しかしながら、赤痢菌による自然免疫応答の回避機構は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

ヒトは病原体を排除するために炎症を引き起こす。しかし病原体は宿主防御機構から逃れて組織に侵入・定着するために、様々な回避機構を獲得してきた。赤痢菌などの腸粘膜病原細菌は、宿主の免疫応答から逃れるためにIII型エフェクターを宿主細胞内に分泌し、免疫シグナルの活性化を抑制していると考えられる。そこで本研究は、免疫応答を抑制する新規のIII型エフェクターを探索し機能解析を試み、赤痢菌感染における感染初期の免疫応答の回避機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

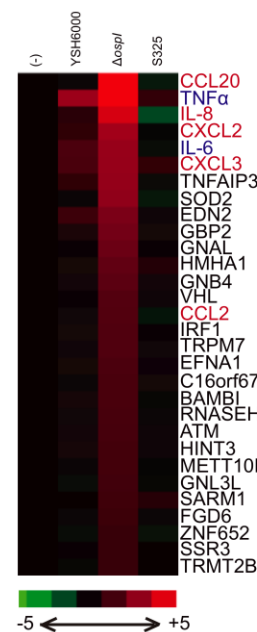
- 1) 免疫応答を抑制する新規のIII型エフェクター (OspI) の機能を細菌側のみならず、宿主細胞側からも検討する。生化学的、細胞生物学的、免疫学的手法を取り入れて解析する事によって、赤痢菌感染における感染初期の免疫応答回避のメカニズムを解明する。
- 2) 動物感染実験を行う。個体レベルで宿主免疫応答におけるエフェクターXの役割について検討する。前年度に作製した赤痢菌エフェクター欠損変異体さらにOspIの機能が失活した点変異体を用いてマウス経鼻感染実験、モルモット直腸感染実験を行う。マウス経鼻感染実験は単球系細胞における影響を、モルモット直腸感染実験は上皮細胞における影響を主に検討することができる実験系であり、OspIの細胞特異性を個体レベルで調べる比較する。感染後の免疫応答は組織におけるNF-κB経路の活

性を、組織と血清中の炎症性サイトカイン、ケモカイン量、組織中の赤痢菌生菌量を指標にして評価する。さらに、感染組織を形態的、免疫化学的に調べる。

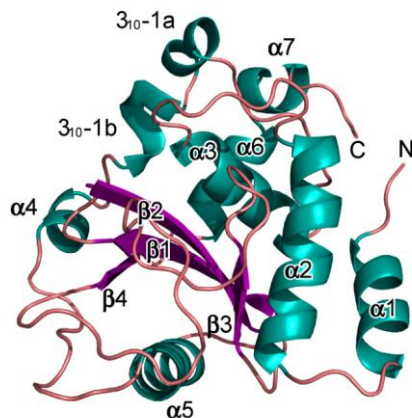
- 3) OspIによる標的因子の作用機序について検討する。前年度におこなったスクリーニングによって標的因子の候補が得られた場合、標的因子のノックダウン細胞や、可能ならばノックアウトマウスを用いて赤痢菌感染実験を行い、OspIによるNF-κB活性化の抑制効果に対する影響を調べる。
- 4) 立体構造を基盤としたOspIの機能解析。立体構造をから予想される機能ドメインについてOspI点変異体を作製し、NF-κB活性化の抑制効果に対する影響を調べる。前年度までに得られた標的因子の候補とOspIとの相互作用について、立体構造から考察する。

4. 研究成果

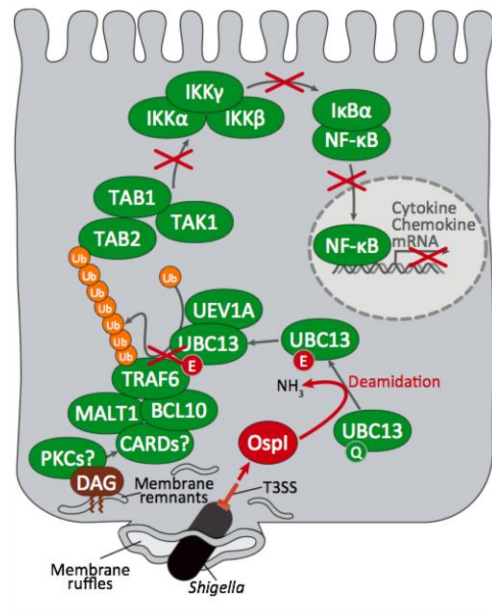
- 1) プロテオミクス解析によって、III型分泌装置から分泌される新規タンパク質の同定を試みた。その結果、赤痢菌のIII型分泌装置によって分泌されるタンパク質OspIを同定した。



- 2) 赤痢菌感染におけるOspIの役割について検討した。野生型および $ospI$ 欠損赤痢菌を感染させたHeLa細胞について、遺伝子の発現量の変化をマイクロアレイ解析によって網羅的に比較した。その結果、 $ospI$ 欠損株感染細胞においてケモカイン ($IL-8$ など) と炎症性サイトカイン ($TNF-\alpha$ など) の顕著な発現量増加が認められた。
- 3) NF- κ Bの活性化経路は宿主の初期免疫応答すなわちケモカイン、炎症性サイトカイン誘導に必須である。そこでNF- κ B経路の活性化におけるOspIの作用について検討した。宿主細胞への赤痢菌侵入に伴い、侵入部位にジアシルグリセロール (DAG) の集積が認められる事を見だし、DAG-CBM複合体-TRAF6-NA- κ B経路の活性化経路の活性化する引き金となる事を示した。さらに、OspIはDAG-CBM複合体-TRAF6-NA- κ B経路を抑制する事を示した。
- 4) OspIは、TRAF6の自己ユビキチン化を抑制する事でTRAF6の活性化を抑制する事を示した。さらにOspIによるTRAF6活性化の抑制機構について検討した。その結果、OspIはTRAF6 (E3:ユビキチンリガーゼ) のE2 (ユビキチン結合酵素) であるUBC13を標的とし、Ubc13の100番目のグルタミン残基を脱アミド化修飾してグルタミン酸に変換することを明らかにした。さらに、OspIによって脱アミド化修飾を受けたUbc13のE2活性は、顕著に低下している事を明らかにした。
- 5) 結晶構造解析(兵庫県立大学、水島 恒裕先生との共同研究)によって、OspIの立体構造を明らかにした。その結果、OspIはシステインプロテアーゼ様の立体構造をもち、システイン (C)、ヒスチジン (H)、アスパラギン酸 (D) からなる活性中心 (C-H-D triad) を持つことが示唆された。



- 6) OspIのC-H-D triadの点変異解析を行った。その結果、C-H-D triadの各点変異体は、OspIによるUbc13の脱アミド化に必須であることを明らかにした。
- 7) 本研究により、感染初期の病原体に対する粘膜上皮の新規な防御機構と、それに対抗する病原体側のあらたな戦術が解明され、これを標的に創薬やワクチン開発への応用が期待される。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. 査読あり

The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response.

真田 貴人、Kim Minsoo、三室 仁美、鈴木 仁人、小川 道永、小山 晃穂、芦田 浩、小林 泰良、小山 智洋、長井信也、柴田 佑里、合田 仁、井上 純一郎、水島恒裕、笹川 千尋、

Nature. 2012 vol.483(7391)、p623-626.

doi: 10.1038/nature10894.

[学会発表] (計1件)

発表者：真田貴人

発表表題 : A bacterial effector deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response

学会名 : 第 85 回日本細菌学会

場所 : 長崎ブリックホール、

日時 : 平成 24 年 3 月 29 日(木)

[その他]

ホームページ等 1 件

(東京大学 記者発表)

http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_240312_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真田 貴人 (Sanada Takahito)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号 : 00569957

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 研究協力者

水島恒裕 (Mizushima Tsunehiro)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号 : 90362269