

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689027

研究課題名(和文)新しい赤痢菌治療薬開発のための赤痢菌エフェクター分子の機能阻害剤探索

研究課題名(英文)Development of new therapeutic tools against pathogenic bacteria

研究代表者

Kim Minsoo (Kim, Minsoo)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：50466835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円、(間接経費) 6,420,000円

研究成果の概要(和文)：近年、多剤耐性菌による感染症例が増加し、新たな治療薬の開発が望まれている。本研究では、赤痢菌の抗生物質に代替となる新しい治療薬の探索・開発のために赤痢菌の病原因子の機能解明を行った。赤痢菌の病原因子であるOspEと宿主蛋白質(ILK)との結合様式を明らかにし、複合体の機能を阻害する化合物の同定を目指した。さらにOspEホモログはO157やサルモネラ属菌などの腸管病原細菌にも保存されていることから、OspEホモログを解析した結果、他の病原細菌の感染成立にも重要な役割をすることを明らかにした。OspEホモログをターゲットとする治療薬は広範な腸管病原細菌に対する治療薬の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Many pathogenic bacteria, including Shigella, enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), and enterohemorrhagic E.coli (EHEC), are associated with diarrheal diseases in young children in developing countries. Although these pathogens are a significant health threat in the developing world, many Japanese people have suffered from O157 infection. However, no effective vaccines have yet been developed. Multi-drug resistant bacteria are increasing problem. Therefore, we aim to develop new therapeutic tools to counteract the progression of these diseases. To develop therapeutic tools against Shigella infection, we have analyzed the role of OspE during Shigella infection. ospE family genes are highly conserved among many enteropathogenic bacteria, including Shigella, O157, Citrobacter rodentium, and Salmonella, suggesting that OspE plays a general role in bacterial infection. We show here that OspE homologs play a key role in the establishment of during other pathogenic bacteria infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：エフェクター 病原細菌 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

腸管病原細菌による腸管感染疾患は、開発途上国を中心に毎年 200 万の人命を奪い、依然として大きな脅威となっている。赤痢菌をはじめとする腸管病原細菌の多くは、飲料水や食物により口から我々の体内に侵入し、腸管の粘膜を構成する上皮細胞を足場として感染する。上皮細胞内に侵入した赤痢菌は増殖しながら隣接細胞へ次々に移動することにより感染を拡大し、その結果、激しい炎症性の血性下痢（赤痢）が発症する。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望まれている。

## 2. 研究の目的

病原細菌の感染に対して、宿主側は感染を受けた上皮細胞の除去、炎症反応などを誘導し、病原細菌が周囲の細胞へ定着することを防いでいる。即ち、これら宿主細胞の反応は「病原体に対する基本的な生体防御システム」として極めて重要な役割を果たしている。しかしながら、赤痢菌をはじめとする腸管病原細菌は、III 型分泌装置と呼ばれる特殊なタンパク質の注入装置により一群の病原因子（エフェクター）を宿主細胞へ分泌する。これらのエフェクターは宿主細胞のアクチン細胞骨格や免疫応答などを制御し、宿主細胞因子を巧みに利用する菌の戦略の一つとして感染成立に重要な役割を担っている。赤痢菌のエフェクター蛋白質の感染に果たす役割を明らかにすることは、感染成立を抑制する手法の開発にもつながると期待される。本研究では、赤痢菌の新しい治療薬開発の究極的な目的として、赤痢菌のエフェクターである蛋白質の機能解析を行い、その機能阻害剤を同定する。さらにエフェクターとそのターゲット宿主蛋白質との結合様式を明らかにし、複合体の機能を阻害する化合物の同定及びより優れた抗菌剤の設計を目指すものである。

## 3. 研究の方法

我々は、赤痢菌が腸管での感染を拡大するために、そのエフェクターである OspE タンパク質を分泌し、感染した腸管上皮細胞の剥離を阻止するという新たな戦略を用いていることを世界に先がけて発表した (nature, 2009)。上皮細胞へ侵入した赤痢菌から分泌される OspE は細胞接着を制御している宿主細胞の ILK (Integrin-linked kinase) と特異的に結合することを見出した。OspE は ILK と細胞接着斑に共局在し、ILK 依存的に接着斑の数を増加させ、細胞接着を強化した。さらに、モルモットを用いた赤痢菌感染実験においては、野生型株比べ、*ospE* 欠損株では、腸管への定着菌数が低下し、上皮細胞の剥離が進んでいた。これらの結果から、OspE は ILK と結合して、細胞の接着を増強することにより、感染した細胞が腸管壁から除去されにくくし、赤痢菌の感染の足場を維持していると考えられた。しかし、OspE により ILK の機能がどのように制御されているかについて、詳しいメカニズムはわかってない。そこで本研究では、(1) OspE による ILK の制御メカニズムを明らかにし、(2) OspE と ILK の結合を阻害する化合物探索を行う。(3) OspE は赤痢菌のみならず、サルモネラ属など幅広い病原細菌に保存されているため、OspE ファミリア-の機能解明のために、OspE ホモログ蛋白質の機能解析を行う。(4) 創薬のターゲットとなりうる新しい細菌の分子標的を得るために、機能未知の新規エフェクターの機能解析及び立体構造解析を行う。

### (1) OspE-ILK 複合体と結合解明

OspE-ILK 複合体の蛋白質群を同定するため、FLAG-ILK を安定的に発現している細胞に、OspE 強制発現細胞または非発現させた細胞株を樹立する。この細胞から抗 FLAG 抗体アフィニティークラムを用いて、ILK 複合体の精製を行い、LC-MS/MS により、OspE-ILK 複合

体と結合分子群を同定する。さらに、X-線構造解析方法を用いて、OspE-ILK 複合体の結合様式を明らかにする。

- (2) OspE-ILK 複合体の結合を阻害する化合物探索のために、OspE と ILK の結合を定量的に検出できる ELISA の系を確立し、阻害剤スクリーニングを行う。
- (3) OspE のホモログ蛋白質の解析  
Citrobacter rodentium の OspE ホモログである OspE(CR) の機能解析のために、マウス腸管感染モデル系を用いて、OspE(CR) の腸管感染への影響を調べた。この際、OspE(CR) が誘起する遺伝子発現変化をマイクロアレイ法・Real-time PCR によりモニターし、発現変動を担うシグナル伝達や転写制御因子を得る。
- (4) 新規赤痢菌のエフェクター (OspH, OspI, IpaH) の機能解析  
創薬の新しいターゲットを得るために赤痢菌の病原因子 (OspH, OspI, OspJ) の機能解析を行った。プレテインアレイ方法を用いて、各病原因子と相互作用する宿主のターゲット蛋白質を得た。両者の結合の意義を、分子生物学・細胞生物学ツールで解析する。さらに、単独または複合体の立体構造解析を行い、病原因子の相互作用基盤を明らかにする。

#### 4. 研究成果

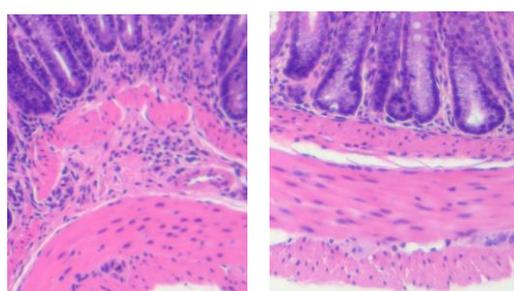
- (1) OspE-ILK 複合体と結合解明  
赤痢菌の病原因子 (OspE) と宿主ターゲット蛋白質 (ILK) との複合体が取る立体構造の決定するための複合体の精製系の構築を行った。OspE と ILK は蛋白精製が容易ではないため、さまざまな欠損変異株を作製し、精製が可能な系を確立した。OspE は分子量が小さいため、NMR 解析に向いている。今後、X 線

結晶解析を行い、OspE-ILK 複合体の立体構造を決定、さらに NMR を用いて OspE 単独構造決定を目指す。

OspE は ILK を膜に局在されることが知られている。OspE-ILK 複合体蛋白質を同定するため、膜と細胞質を分画し、それぞれの分画で ILK 複合体を精製・比較を行った。その結果、OspE-ILK 依存的に膜と細胞質分画で差が見える蛋白質郡が見つかった。今後、LC-MS 解析を行いこれらの蛋白質郡を同定・解析を目指す。

- (2) OspE-ILK 複合体阻害剤開発  
OspE-ILK 複合体の結合阻害剤開発するため、ILK と結合する OspE のペプチドを検索・同定した。同定した OspE のペプチドと ILK の結合を阻害する化合物を探索するためのハイスループットスクリーニング系の確立を目指した。そのために ILK に結合に重要なトリプトファン残基を含む OspE の C 末端部分のペプチドを作製した。さらにトリプトファン残基をアラニン変換した変異を持つペプチドを作製し、ILK との結合力を調べた。OspE のペプチドと ILK と分子間の相互作用を蛍光偏光法で測定するアッセイ系、さらに細胞の運動阻害能を測定するアッセイ法を確立した。今後、確立したスクリーニング系を用いて、大規模スクリーニングを行い、阻害剤同定を目指す。
- (3) OspE のホモログ蛋白質の解析  
citrobacter rodentium の OspE ホモログ蛋白質である OspE (CR) の解析を行った。野生株及び OspE(CR) の欠損株をマウスの腸管に感染させ、感染応答を調べた。その結果、野生株感染組織では、感染多くの免疫細胞の浸潤炎症性サイトカインやケモカインの上昇が認められたが、OspE(CR) 欠損株の感染

組織ではこのような炎症応答は認められなかった(図 1)。さらに OspE(CR) 欠損株の感染組織では定着菌数も顕著な減少が認められた。これらの感染組織を用いて、マイクロアレイ解析を行い、OspE(CR) 依存的に発現が変動する遺伝子群を調べた。その結果、免疫応答に関係する遺伝子群が同定され、OspE(CR) は感染時の免疫応答を制御す



野生株感染                      ospE 欠損株感染

図 1. OspE ホモログ解析

ると考えられる。これらの結果から他の病原細菌の OspE も感染成立に重要な役割をすることを明らかにした。

(4) 新規赤痢菌のエフェクター (OspH, OspI, OspJ) の機能解析

赤痢菌治療薬の分子標的を探すために新たな病原因子の機能解析を行った。OspI の X 線結晶解析の結果、脱アミド化酵素であることを発表した。その基質である Ubc13 と OspI (CA) の複合体構造を解き、両者の結合・脱アミド化反応に重要なアミノ酸残基を同定した(図 2)。さらに新しく同定された病原因子である OspH の解析を行い、OspH に結合する

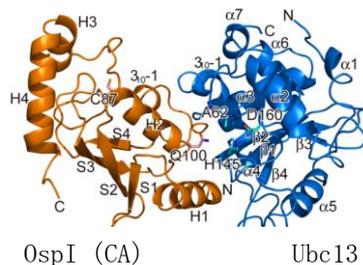


図 2. OspI-Ubc13 複合体解析

宿主蛋白質を同定した。OspH を宿主細胞に発現させると宿主細胞の蛋白輸送に異常があることを見いだした。

OspJ, OspH の欠損株をマウス肺に感染させ、感染応答を調べた結果、野生株赤痢菌感染組織に比べ、OspJ 欠損株と OspH 欠損株の感染肺組織では多くの免疫細胞の浸潤炎症性サイトカインやケモカインの上昇が認められた。この結果から OspJ と OspH は赤痢菌感染において、炎症反応を抑制していると考えられる。

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 10 件)

- ① Nishide A, Kim M, Takagi K, Himeno A, Sanada T, Sasakawa C, Mizushima T, Structural basis for the recognition of Ubc13 by the Shigella flexneri effector OspI, *J Mol Bio.* 査読有, 425(15), 2013, 2623-2631.  
DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.037
- ② Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, Mimuro H, Kim M, Ashida H, Akakura R, Yoshida M, Kawalec M, Reichhart J-M, Mizushima T, Sasakawa C, The Shigella OspC3 effector inhibits Cspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection, *Cell Host Microbe.* 査読有, 13(5) 2013, 570-83.  
DOI: 10.1016/j.chom.2013.04.012
- ③ Takeshita K, Tezuka T, Isozaki Y, Yamashita E, Suzuki M, Kim M, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa A, Structural flexibility regulates phosphopeptide-binding activity of the tyrosine kinase binding domain of

- Cbl-c, *J Biochem*. 査読有, 152(5), 2012, 487-495.  
DOI: 10.1093/jb/mvs085
- ④ Kawauchi K, Tan WW, Araki K, Bakar F, Kim M, Fujita H, Hirata H, Sawada Y, p130Cas-dependent actin remodeling regulates myogenic differentiation, *Biochemical Journal*, 査読有, 445(3), 2012, 323-332.  
DOI: 10.1042/BJ20112169
- ⑤ Sanada T, Kim M, Mimuro H, Suzuki M, Ogawa M, Oyama A, Ashida H, Kobayashi T, Koyama T, Nagai S, Shibata Y, Ghoda J, Inoue J-I, Mizushima T, Sasakawa C, The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response, *Nature*, 査読有, 483(7391), 2012, 623-626.  
DOI: 10.1038/nature10894
- ⑥ Fukumatsu M, Ogawa M, Arakawa S, Ahida H, Suzuki M, Nakayama K, Shimizu S, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C, *Shigella* targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical Clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells, *Cell Host and Microbe*, 査読有, 11(4), 2012, 325-336  
DOI: 10.1016/j.chom.2012.03.001.
- ⑦ Suzuki T, Kim M, Kozuka-Hata H, Watanabe M, Oyama M, Tsumoto K, Yamamoto T, Monoubiquitination of Tob/BTG family proteins competes with degradation-targeting polyubiquitination, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 409(1), 2011, 70-74.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.107
- ⑧ Watanabe M, Suzuki T, Kim M, Abe Y, Yoshida Y, Sugano S, Yamamoto T, Coronin7 forms a novel E2 ubiquitin ligase complex to promote the degradation of the anti-proliferative protein Tob, *FEBS Letters*, 査読有, 585, 2011, 65-70.  
DOI: 10.1016/j.febslet
- ⑨ Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C, Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier, *Nat Chem Biol*. 査読有, 8(1), 2011, 36-45.  
DOI: 10.1038/nchembio.741.
- ⑩ Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C, Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival, *Journal of Cell Biology*, 査読有, 195(6), 2011, 931-42  
DOI: 10.1083/jcb.201108081
- [学会発表] (計 3 件)
- ① 金 玫 秀 , Real-time, label-free monitoring of poly ubiquitin chain formation with bacterial ubiquitin ligase, The 35<sup>th</sup> Naito conference, 2013年7月10日、札幌、日本
- ② 金 玫 秀、「病原細菌感染における宿主翻訳後修飾」、日本生化学学会大会、2012年12月16日、福岡、日本
- ③ 金 玫 秀, Regulation of host cell-cycle progression by bacterial pathogens, Ubiquitin Drug Discovery & diagnostics 2011, 2011年7月12日, Philadelphia, 米国
- [図書] (計 1 件)
- ① 金 玫 秀、医学のあゆみ、病原性細菌によるユビキチン修飾系の制御、2012、243(6), 535-540
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/saikan/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金 玟秀 (MINSOO, KIM )  
東京大学医科学研究所・特任准教授  
研究者番号：50466835

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：