

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790472

研究課題名（和文）：赤痢菌 IpaH タンパク E3 リガーゼ活性による宿主シグナル伝達阻害機構の解明

研究課題名（英文）：Molecular analysis of *Shigella* effector IpaH E3 ligase activity

研究代表者 芦田 浩（ASHIDA HIROSHI）

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：10535115

### 研究成果の概要（和文）：

本研究では赤痢菌エフェクタータンパクの一つである IpaH0722 の宿主シグナル伝達阻害機構の解明を試みた。IpaH0722 は赤痢菌感染時のファゴソーム破壊により誘導される PKC-NF- $\kappa$ B 経路を自身の有する E3 リガーゼ活性依存的に阻害することが明らかとなった。その抑制機構を解析したところ、シグナル因子である TRAF2 を標的とし、ユビキチン化、プロテアソーム分解へと導くことで NF- $\kappa$ B 活性化を抑制することが示された。

### 研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried to identify the mechanism of IpaH0722 in *Shigella* infection. IpaH0722, which has an E3 ubiquitin ligase activity, inhibits NF- $\kappa$ B activity in its E3 ubiquitin ligase dependent manner. As a result, we found that IpaH0722 inhibits phagosome disruption mediated PKC-NF- $\kappa$ B activation by targeting TRAF2 for ubiquitination and proteasome-dependent degradation, thereby downregulating host inflammatory responses.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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、赤痢菌、ユビキチン、NF- $\kappa$ B

#### 1. 研究開始当初の背景

赤痢菌をはじめとする多くのグラム陰性病原細菌は、高度に保存されたニードル状の III 型分泌装置より種々の病原因子（エフェクター）を宿主細胞内に注入し、細胞機能を菌にとって有利なものへと修飾することで感染を引き起こす。病原細菌の感染は、宿主内で様々なシグナル伝達経路の活性化を通じて生体防御反応を誘導し、菌の排除へと働く。このように宿主の生体防御反応は菌の感染の持続を困難なものとするが、赤痢菌はこのような宿主による攻撃を看過するのではなく、赤痢菌の有する III 型分泌装置より分泌される種々のエフェクターの働きにより、宿主シグナル伝達経路を様々な方法で阻害し、その攻撃を回避するといった生存戦略を備えている。

赤痢菌のエフェクターの一つである IpaH ファミリータンパクは、その C 末端領域中に E3 ユビキチンリガーゼ活性を有し、赤痢菌の病原性プラスミドおよび染色体上に 10 コピーが存在し、相互に高い相同性を有している。IpaH ファミリーの多くはシグナル伝達経路の阻害による宿主炎症反応抑制に寄与することが明らかになっているが、詳細な解析はなされていない。

#### 2. 研究の目的

IpaH ファミリータンパクが E3 ユビキチンリガーゼ活性を有することから、宿主標的タンパクをユビキチン化修飾し、シグナル伝達を阻害することで生体防御反応による攻撃を回避し、菌の感染持続に寄与しているとい

う仮説が導きだされる。IpaH タンパクによる宿主シグナル伝達阻害能は赤痢菌の感染持続において不可欠なものであるが、その標的因子および詳細な阻害機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、赤痢菌のエフェクターIpaH ファミリータンパク E3 リガーゼ活性による宿主シグナル伝達阻害機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

赤痢菌 IpaH ファミリータンパク E3 リガーゼ活性によるシグナル伝達阻害機構の解析において、本研究では、(1) IpaH ファミリータンパクの宿主標的因子の検索、(2) IpaH-宿主標的因子間の機能解析、(3) 動物感染実験による IpaH ファミリータンパクシグナル伝達阻害能の確認、の3点を遂行した。

#### (1) IpaH ファミリータンパクの宿主標的因子の検索

赤痢菌感染に伴い活性化される、各種シグナル伝達経路の下流に位置する様々な転写因子のレポーターアッセイを用いることにより、IpaH ファミリータンパクの作用するシグナル伝達経路を特定した。得られたシグナル伝達経路の因子を Pull-down assay、免疫共沈降法といったタンパク-タンパク間の相互作用を利用した手法を用いて、各 IpaH ファミリータンパクの宿主細胞内標的因子を探索した。得られた標的因子候補は、一連のレポーターアッセイにより特定された各 IpaH タンパクの標的とするシグナル伝達経路との整合性の検証後、IpaH タンパクとの結合能の確認、また共焦点レーザー顕微鏡を用いた、宿主細胞内共局在を確認を行ない、標的タンパクとして同定した。

#### (2) IpaH-宿主標的因子間の機能解析

IpaH ファミリータンパクは E3 ユビキチンリガーゼ活性を有するため、その標的因子は IpaH タンパクにより、ユビキチン化修飾をされることが推測される。そこで、ユビキチネーションアッセイにより、標的因子の IpaH タンパクによるユビキチン化の有無を確認し、標的因子としての真偽を評価した。また、細胞内においてユビキチン化修飾を受けたタンパクは、タンパク分解、エンドサイトーシス、細胞内シグナル伝達の伝令、など様々な運命をたどることが報告されていることから、IpaH タンパクによりユビキチン化修飾された標的因子の細胞内における動向を明らかにした。

#### (3) 動物感染実験による IpaH ファミリータンパクシグナル伝達阻害能の確認 赤痢菌野生株、*ipaH* 遺伝子欠損株および

*ipaH* 過剰発現株を用いて、マウスの経鼻感染実験を行ない、病原性および宿主免疫応答の評価を行なった。具体的には、赤痢菌感染により惹起される炎症を病理解析およびサイトカイン産生量 (ELISA 測定) により確認した。

### 4. 研究成果

赤痢菌感染時の転写因子活性測定により、各 IpaH タンパクの作用するシグナル伝達経路の特定を試みた。この結果、IpaH ファミリーのうち、IpaH0722 は自身の E3 リガーゼ活性依存的に NF- $\kappa$ B 活性化を抑制していることが明らかとなった。そこで IpaH0722 の赤痢菌感染時の NF- $\kappa$ B 抑制機構の解明を行った。赤痢菌は宿主細胞内へと侵入後、ファゴソーム膜に包まれるが、菌はこれを速やかに破壊し、細胞質中へと離脱、分裂、増殖を繰り返し、隣接細胞へ感染を拡大していく。この際、破壊されたファゴソーム膜に含まれるジアシルグリセロール (DAG) が細胞内で危険信号 (DAMPs) として働き、DAG 受容体であるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を介し、NF- $\kappa$ B 活性化を誘導することを明らかにした。IpaH0722 はこの赤痢菌感染時の DAG-PKC 依存的な NF- $\kappa$ B 経路を特異的に抑制することから、DAG-PKC-NF- $\kappa$ B 経路における IpaH07 標的因子を探索したところ、下流のシグナル因子 TRAF2 との結合、ユビキチン化、プロテアソーム分解への誘導が確認された。以上より、IpaH0722-TRAF2 間の相互作用が赤痢菌感染時のファゴソーム破壊による DAG-PKC-NF- $\kappa$ B 活性化を阻害、炎症反応を抑制することが示された。

### 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 8 件)

1. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, & Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nature Chem Biol.* 8, 36-45 (2012).
2. Sanada T, Kim M, Mimuro H, Suzuki M, Ogawa M, Oyama A, Ashida H, Kobayashi T, Koyama T, Nagai S, Shibata Y, Gohda J, Inoue J, Mizushima T, & Sasakawa C. The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. *Nature.* 483, 623-626 (2012).

3. 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. *J Cell Biol.* 195, 931-42 (2011).
4. Ashida H, Ogawa M, Mimuro H, Kobayashi T, Sanada T, & Sasakawa C. *Shigella* are versatile mucosal pathogens that circumvent the host innate immune system. *Curr Opin in Immunol.* 23, 448-55 (2011).
5. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Suzuki S, Sanada T, Punginelli C, Mimuro H, & Sasakawa C. *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. *Curr Opin in Microbiol.* 14, 16-23 (2011)
6. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, Mimuro H. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* Type IV secretion system activity. *J Biol Chem.* 286, 25256-64. (2011).
7. Ogawa M, Yoshikawa Y, Kobayashi T, Mimuro H, Fukumatsu M, Kiga K, Piao Z, Ashida H, Yoshida M, Kakuta S, Koyama T, Goto Y, Nagatake T, Nagai S, Kiyono H, Kawalec M, Reichhart JM, Sasakawa C. A *tecpr1*-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. *Cell Host Microbe.* 9, 376-89 (2011).
8. Ogawa M, Mimuro H, Yoshikawa Y, Ashida H, & Sasakawa C. Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit. *Microbiol Immunol.* 55, 459-471 (2011).

[学会発表] (計 4 件)

3. 芦田 浩、笹川 千尋 口頭発表 “赤痢菌 IpaH エフェクタータンパクの機能解析” 第 86 回日本細菌学会総会、千葉、2013 年 3 月 18 日～20 日
2. Ashida H and Sasakawa C. 口頭発表 “ *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses.” Singapore-Japan Joint Forum Emerging Concepts in Microbiology. Singapore. 2011. Nov. 16<sup>th</sup>.

3. 芦田 浩、笹川 千尋 口頭発表 “ *Shigella* effector protein modulates host inflammatory responses.” 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、2012 年 3 月 27 日

4. ○Ashida H and Sasakawa C. ポスター発表 “ *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses.” International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Japan. 2011. Sep. 8<sup>th</sup>.

[図書] (計 1 件)

芦田浩、真田貴人、笹川千尋 「赤痢菌による自然免疫克服戦略」、実験医学増刊 感染・共生・生体防御システム、p61-70、2012

[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

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
芦田 浩 (ASHIDA HIROSHI)  
東京大学・医科学研究所・特任助教  
研究者番号：10535115

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：