

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790420

研究課題名(和文)細胞侵入性細菌における菌体のユビキチン化関連因子の解析

研究課題名(英文)Ubiquitination mechanism of intracellular bacteria

研究代表者

吉川 悠子 (YOSHIKAWA, YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：00580523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：損傷を受けたミトコンドリアや変性タンパク質からなる細胞内凝集体と同様に、細胞内侵入性細菌に付加されたポリユビキチン鎖はオートファジーによって分解・除去すべき異物認識のための目印となる。本研究では、リステリア(*Listeria monocytogenes*) actA欠損株に対するユビキチン化機構の解明を試みた。LC-MS/MS解析の結果、actA欠損株のユビキチン化に関わる可能性のある3種類のユビキチンリガーゼ(E3)が得られた。actA欠損株感染細胞内におけるこれらE3の局在を観察したところ、菌体のユビキチン化が始まる感染1時間後に1つのE3が菌体周囲に集積していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Poly-ubiquitination is a trigger of selective autophagy for clearance of injured mitochondria and aggregates derived from denatured proteins. Some of intracellular bacteria are also ubiquitinated and then eliminated by selective autophagy in the same manner. In this study, we attempted to identify the ubiquitination mechanisms of ActA-deficient *Listeria monocytogenes* (Δ actA). A total of 29 candidates (2 listerial and 27 host proteins) were identified by LC-MS/MS analysis. E3 is known to be playing an important role for ubiquitination of other intracellular bacteria, such as *Salmonella* and *Mycobacterium tuberculosis*. There were 3 kinds of ubiquitin ligases (E3) in the host candidates. We therefore analyzed the localization of E3s in the cells infected with Δ actA. As a result, E3-1 was accumulated around the bacterial cells 1 hour postinfection simultaneously with starting point of the Δ actA ubiquitination.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細菌 リステリア 感染症 オートファジー ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内分解系のオートファジーは細胞の恒常性の維持のみならず、細胞内に侵入した細菌を選択的に認識し、隔離・分解する、自然免疫としての機能を持つことが明らかとなった。しかし、多くの細胞内侵入性細菌は独自の方法でオートファジーを巧みに回避し、さらに、一部の菌ではオートファゴソームを自らの増殖の場として利用することが報告されている。

代表的な細胞内侵入性細菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*) は汚染された食品や水を媒介としてヒトに感染し、リステリア症を起こす。リステリア症の集団発生は世界中で報告されている。リステリアは非貪食性の細胞にも侵入し、菌体外に分泌した毒素リステリオリシンOにより宿主細胞膜を溶解して細胞質へ脱出する。その後、リステリアは菌体表面のActAタンパク質により、Arp2/3複合体およびVASPなどのアクチン重合に関わる宿主タンパク質を菌体周囲に集積させる。そして、リステリアは菌の一極でアクチン重合を促進し、これにより得られる推進力を利用して細胞内を運動することで、隣接細胞へと感染を拡大する。この細胞内運動により、リステリアはオートファジーから「逃げて」いるものと考えられていた。しかし、研究代表者らは、リステリアがActAにより宿主タンパク質を菌体表面へ集積させることでオートファジーを回避すること、この回避は菌の細胞内運動性には依存しないこと、宿主タンパク質を集積できない *actA* 欠損株においては、菌体表面が直接ユビキチン化され、ポリユビキチン鎖とオートファジーのマーカータンパク質であるLC3の間をつなぐ p62 タンパク質の集積により、選択的に *actA* 欠損株がオートファジーに認識されることを明らかにした (*Nat. Cell Biol.*, 2009)。さらに最近、リステリアのオートファジー認識からの回避について、アクチン重合に関わる宿主タンパク質だけではなく、リステリアの表面タンパク質である InlK が細胞質小器官 Vault を構成する Major Vault Protein (MVP) と結合し、MVP がリステリアの表面を覆うことで菌体のユビキチン化を防いでいることも報告された (*PLoS Pathog.*, 2011)。

2. 研究の目的

細胞内分解系であるユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー系は細胞の恒常性維持のため、協調して機能する。高度にユビキチン化された変性タンパク質からなる細胞内の凝集体は、プロテアソームでの分解が物理的に不可能であるため、p62 タンパク質などのアダプタータンパク質を介し、オートファジーにより分解される。損傷を受けたミトコンドリアもまたユビキチン化され、オートファジーによって除去される。さらに、細胞内侵入性細菌に対するオートファジーにおいても、ポリユビキチン鎖が異物認

識に重要な役割を果たすことが報告されている。細胞内侵入性細菌のうち、グラム陽性菌のリステリア、グラム陰性菌のサルモネラ (*Salmonella Typhimurium*)、脂質に富む細胞壁を持つ抗酸菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) では、それぞれ菌体の表層構造が大きく異なる。これまでに、細胞内侵入性細菌の菌体のユビキチン化に関するユビキチンリガーゼ (E3) として、サルモネラでは LRSAM1 (*PNAS*, 2011) が、結核菌では Parkin (*Nature*, 2013) が報告されている。そのため、リステリアに対するユビキチン化機構の解明は、細胞内侵入性細菌に対する感染防御を考える上で極めて重要である。

イヌ尿細管上皮細胞由来 MDCK 細胞に感染後 2 時間経過した *actA* 欠損株は菌体表面が全周にわたってユビキチン化される。このことから、ユビキチン化を受ける基質分子は菌体表面に普遍的に分布しているものと考えられる。そこで本研究では、リステリア菌体側のユビキチン化される分子や宿主側のユビキチン化関連分子の同定および解析を試み、宿主細胞の自然免疫システムにおけるユビキチンの役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌側分子の探索

リステリアの菌体表面タンパク質は SDS 処理により菌体から分離されることが報告されている (*J. Cell Sci.*, 2000)。また、これまでに、ユビキチン化された *actA* 欠損株を SDS 処理すると、ユビキチン化タンパク質は菌体から分離されることをウエスタンブロットングにて確認している。

まず、先行研究にて *in vitro* ubiquitination assay と LC-MS/MS 法とを組み合わせた解析により得られた、菌側候補分子に対する直接的なユビキチン化を調べた。ユビキチンが共有結合するリジン残基を持たない HA タグ

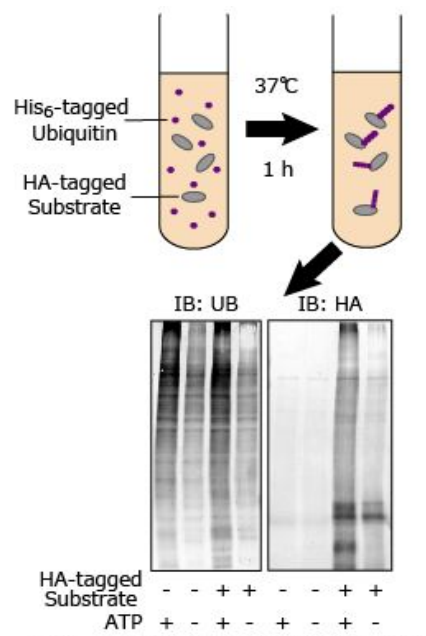


図 1. *in vitro* ubiquitination assay

(YPYDVPDYA)と候補分子を融合させたりコンピナントタンパク質を精製し、スクリーニングと同じ条件下で *in vitro* ubiquitination assay を行った(図1)。リステリアに対し、いずれの E3 がこの反応に関与するのか不明なため、反応液中の E3 供給源として、タンパク質分解が旺盛なウサギ網状赤血球の溶解液を調製した Fraction II を用いた。反応後、候補分子のユビキチン化について抗 HA タグ抗体または候補分子に対する特異抗体を用い、ウエスタンブロッティングを行った。並行して、抗 HA タグ抗体にて免疫沈降を行い、抗ユビキチン抗体または特異抗体を用いて同様にユビキチン化の有無を解析した。

次に、感染時におけるリステリア側候補分子の発現部位について特異抗体を用いて免疫学的に解析した。

(2) 宿主側分子の探索

直接ユビキチン化を受ける可能性のある菌側候補分子が一つ検出されたため、宿主側のユビキチン化反応に関与する分子の網羅的な解析を bait として菌側候補分子を用いた Yeast Two Hybrid法にて行った。得られた陽性クローンについて GST タグを付加したりコンピナントタンパク質を作製し、菌側候補分子との結合を pull-down assay にて解析した。

先行研究にて得られた27種の宿主側候補分子のうち、E3としての機能が既に報告されている分子が3種類存在した。これらの発現を RNAi法にて抑制させた MDCK細胞に *actA* 欠損株を感染させ、ユビキチンおよび LC3 陽性菌の割合を測定した。さらに、宿主側候補分子の細胞内での局在を免疫学的に解析した。

4. 研究成果

これまでの先行研究にて、ユビキチン化の基質となる *actA* 欠損株側の候補分子が2種類、宿主側の候補分子は27種類得られている。直接的な菌側候補分子のユビキチン化を確認するために、それぞれに HA タグを付加したりコンピナントタンパク質を用いて、*in vitro* ubiquitination assay を行った。その結果、このうち1種類の候補分子が直接ユビキチン化を受けることが分かった(図1)。

次に、この菌側候補分子と結合する宿主側分子を Yeast Two Hybrid法にて探索した。その結果、10個の陽性クローンが得られた。しかし、GST タグを付加したこれら陽性クローンを用いて pull-down assay を行ったが、どの陽性クローンも菌側候補分子とは結合しなかった。

また、菌側候補分子の特異抗体を用いたウエスタンブロッティング法および免疫蛍光抗体法にて、この候補分子の菌体表面での発現を解析したが、いずれも宿主細胞内での菌体表面における発現は観察されなかった。

以上の結果から、*actA* 欠損株のユビキチン化は菌体表面に発現する分子が直接宿主細胞

のユビキチン修飾系に基質として認識されているのではなく、ActAタンパク質が発現していない、または機能しない場合に菌体表面に結合する宿主タンパク質を通じた間接的なユビキチン化である可能性が高いことが示唆された。

一方、27種類の宿主側候補分子のうち13種類がユビキチン化関連分子であった。標的タンパク質に対するユビキチンの付与は、E3の選択的かつ状況に応じた基質の識別、E3の量的変動などE3の活性依存的に制御されている。13種類のユビキチン化関連分子のうち、E3活性を有することが既に報告されている3種類(E3-1~3)に焦点を絞り、*actA* 欠損株のユビキチン化の解析を行った。

先行研究においても、RNAi法にてそれぞれのE3の発現をロックダウンさせた MDCK細胞に *actA* 欠損株を感染させ、ユビキチン化される菌体の割合を測定したが、コントロールと比べ、有意な差はなかった。そこで、ユビキチン化が始まる感染1時間で観察を行った結果、E3-1の発現を抑制した細胞内では、*actA* 欠損株のユビキチンおよび LC3 陽性菌の割合がコントロールと比べ有意に低下した(図2)。

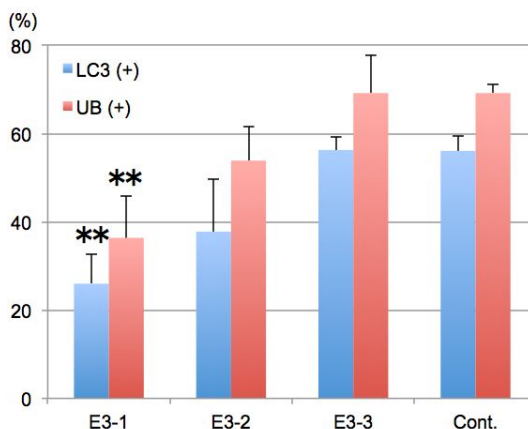


図2. 宿主E3候補因子の発現抑制細胞内での *actA* 変異株のユビキチンまたは LC3 陽性菌数の割合 (**: $p < 0.01$ one-way ANOVA, Dunnett test)

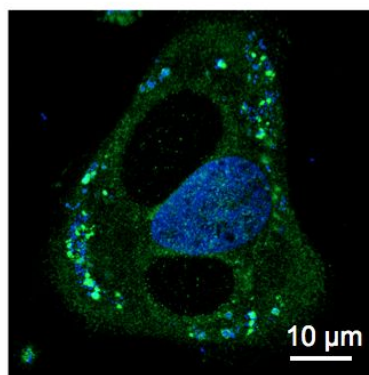


図3. ヒト結腸がん由来 SW480 細胞内での *actA* 変異株のユビキチン化 (青: DNA、緑: ユビキチン)

しかし、MDCK細胞のE3-1に対して市販の抗体が反応せず、さらなる解析が困難であった。*actA*欠損株に対するユビキチン化およびオートファジー活性は培養細胞によって差が大きく、一般的に細菌感染症研究で多用されているヒト子宮頸がん由来のHeLa細胞ではMDCK細胞と比べ、著しく活性が低い。*actA*欠損株に対するユビキチン化およびオートファジーがMDCK細胞に匹敵するヒト由来培養細胞を探索した結果、結腸がん由来SW480細胞が得られた(図3)。そこで、*actA*欠損株感染SW480細胞を用いてE3-1の細胞内での局在を免疫蛍光染色にて観察したところ、菌体のユビキチン化が始まる感染1時間後から*actA*欠損株の菌体周囲へのE3-1の集積が観察された(図4)。

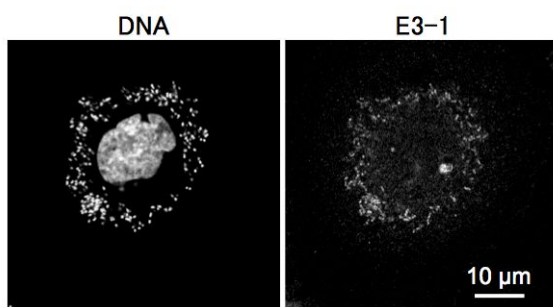


図4. *actA*変異株感染90分後におけるSW480細胞内でのE3候補因子E3-1の菌体周囲への集積

先行研究にて、E3-1を恒常的に発現させたMDCK細胞を作製し、*actA*欠損株のユビキチンおよびLC3陽性菌の割合を解析したが、有意な差は見られなかった。しかし、本研究で*actA*欠損株に対するユビキチン化に関して、E3-1の時間・空間的関与が示唆されたことから、さらに詳細な解析を続ける必要があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Todoroki K., Ishii Y., Miyauchi C., Kitagawa S., Min J. Z., Inoue K., Yamanaka T., Suzuki K., Yoshikawa Y., Ohashi N. and Toyo'Oka, T., Simple and sensitive analysis of histamine and tyramine in Japanese soy sauces and their intermediates using the stable isotope dilution HILIC-MS/MS method., *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, Vol. 62, 2014, p. 6206-6211, DOI: 10.1021/jf500767p

Gaowa, Yoshikawa Y., Ohashi N., Wu D., Kawamori F., Ikegaya A., Watanabe T., Saitoh K., Takechi D., Murakami Y., Shichi D., Aso K. and Ando S., *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in humans, Japan, 2010-2011., *Emerg. Infect. Dis.*, 査読

有, Vol. 20, 2014, p. 508-509, DOI: 10.3201/eid2003.1313337

Ito K., Hikida A., Kawai S., Lan V. T., Motoyama T., Kitagawa S., Yoshikawa Y., Kato R. and Kawarasaki Y., Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library., *Nat. Commun.*, 査読有, Vol. 4, 2013, p. 2502, DOI: 10.1038/ncomms3502

Ohashi N., Gaowa, Wuritu, Kawamori F., Wu D., Yoshikawa Y., Chiya S., Fukunaga K., Funato T., Shiojiri M., Nakajima H., Hamauzu T., Takano A., Kawabata H., Ando S. and Kishimoto T., Human granulocytic anaplasmosis, Japan., *Emerg. Infect. Dis.*, 査読有, Vol. 19, 2013, p. 289-292, DOI: 10.3201/eid1902.120855

Gaowa, Ohashi N., Aochi M., Wuritu, Wu D., Yoshikawa Y., Kawamori F., Honda T., Fujita H., Takada N., Oikawa Y., Kawabata H., Ando S. and Kishimoto T., *Rickettsiae* in ticks, Japan, 2007-2011., *Emerg. Infect. Dis.*, 査読有, Vol. 19, 2013, p. 338-340, DOI: 10.3201/eid1902.120856

Shinohara M., Uchida K., Shimada S., Tomioka K., Suzuki N., Minegishi T., Kawahashi S., Yoshikawa Y. and Ohashi N., Application of a simple method using minute particles of amorphous calcium phosphate for recovery of norovirus from cabbage, lettuce, and ham., *J. Virol. Methods*, 査読有, Vol. 187, 2013, p. 153-158, DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.09.025

Klionsky D. J., et al. (1226名, 1220番目: アルファベット順), Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy., *Autophagy*, 査読有, Vol. 8, 2012, p. 445-544, DOI: 10.4161/auto.19496.

〔学会発表〕(計14件)

大石美月, 吉川悠子, 大島寛史, 三好規之, グラム陰性菌リポ多糖構成分子 lipid A の LC-MS 分析法の確立, 日本農芸化学会 2015 年度岡山大会, 2015 年 3 月 28 日, 岡山大学(岡山)

岩井克機, 尾崎順哉, 吉川悠子, 大橋典男, 漬物より分離した乳酸菌が有する抱合胆汁酸脱抱合酵素の解析, 日本農芸化学会 2015 年度岡山大会, 2015 年 3 月 28 日, 岡山大学(岡山)

高田歩, 呉東興, 吉川悠子, 大橋典男, 静岡県野生動物から得たマダニ類 (Ixodidae), 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月 28 日, 金沢大学(金沢)

呉東興、高娃、吉川悠子、川森文彦、川上万理、岸本壽男、森田裕司、増澤俊幸、安藤秀二、大橋典男、アナプラズマ症の特異抗体検出による患者探索の現状報告、第 21 回リケッチア研究会 研究発表会、2014 年 12 月 21 日、国立感染症研究所(東京)

吉川悠子、片柳悠紀、三好規之、福富竜太、大橋典男、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスにおけるトマトサポニンの抗炎症効果、第 19 回日本フードファクター学会、2014 年 11 月 8 日、鹿児島大学(鹿児島)

呉東興、高娃、吉川悠子、川森文彦、川上万理、岸本壽男、森田裕司、増澤俊幸、安藤秀二、大橋典男、*Anaplasma phagocytophilum* 感染患者血清中に存在する抗体の検出法に関する検討、第 97 回日本細菌学会関東支部総会、2014 年 10 月 31 日、東京ドームホテル(東京)

高田歩、佐々木彰央、吉川悠子、大橋典男、南アルプス産トガリネズミ 2 種に寄生するケモチダニ類の新たな知見、2014 年度日本ダニ学会、2014 年 10 月 18 日、いわて県民情報交流センター アイーナ(盛岡)

Ohashi N., Yoshikawa Y., Gaowa, Wuritu, Wu D. and Kawamori F., Tick-associated *Anaplasmataceae* pathogens in Japan., XIV International Congress of Acarology, 2014 年 7 月 18 日、国立京都国際会館(京都)

Yoshikawa Y., Sugimoto K., Gaowa and Ohashi N., Accommodation responses of *Anaplasma phagocytophilum* during the multiplication in the host cells., 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 27 日、タワーホール船堀(東京)

Yamazaki M., Yoshikawa Y., Sugimoto K., Serizawa T., Tanaka M., Murakami T., Masuda R., Kobayashi Y., Koide H., Oku N. and Ohashi N., Protective ability of lactic acid bacteria isolated from wasabi-zuke for *Citrobacter rodentium* infection in mouse, 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸国際会議場(神戸)

淵田琢、廣井みどり、川森文彦、吉川悠子、大橋典男、Complete sequences and comparative analysis of IncN plasmids encoding *blact_X-M-2* from broiler and human origins, 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡)

〔図書〕(計 1 件)

増田修一、池田隆幸、石原健吾、宇都宮信子、大野浩之、大橋典男、佐野満昭、島村裕子、杉山千歳、滝川和郎、對尾征彦、吉川悠子、吉田啓子、アイ・ケイ・

コーポレーション、改訂新版 健康と食の安全を考えた食品衛生学実験、II 章 微生物の試験 SECTION 1 微生物試験の基礎、2013、pp. 6-18 (総 188 頁)、

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉川 悠子 (YOSHIKAWA, Yuko)
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
研究者番号：00580523