

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460527

研究課題名(和文) 病原細菌IpaHファミリーエフェクターの包括的機能解析

研究課題名(英文) The comprehensive study of bacterial IpaH family effectors

研究代表者

芦田 浩 (Ashida, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：10535115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では赤痢菌エフェクターであるIpaHファミリータンパクの包括的機能解析を行った。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- κ 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- κ B活性化を抑制することが示された。一方、IpaH5はI型インターフェロン活性化を抑制していることが明らかとなった。IpaH5は宿主標的Xと結合しユビキチン化修飾、プロテアソーム分解へと導くことでそのシグナルを抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify the mechanism of IpaH family effector proteins, which have E3 ubiquitin ligase activity, in Shigella infection. One of IpaH family protein, IpaH0722 inhibits NF- κ B activity in its E3 ubiquitin ligase dependent manner. As a result, we found that IpaH0722 inhibits phagosome disruption mediated PKC-NF- κ B activation by targeting TRAF2 for ubiquitination and proteasome-dependent degradation, thereby downregulating host inflammatory responses. In addition, another IpaH family protein, IpaH5 inhibits DNA dependent type I interferon signaling by targeting signaling factor X for ubiquitination.

研究分野：細菌学

キーワード：赤痢菌 エフェクター 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

赤痢菌が感染を成立させるためには、さまざまな生体防御反応と対峙する必要がある。生体側は感染初期に菌の侵入を感知、増殖を阻止する自然免疫系を発動することで、菌の感染を効果的に阻止する。しかしながら、赤痢菌はこれらの自然免疫応答による攻撃を看過するのではなく、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）を宿主細胞内に分泌することで抵抗する。細胞内へと移行したエフェクターは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。これまで赤痢菌エフェクターは 50 個程度が同定されているが、その多くは未だ機能が明らかにされていない。

2. 研究の目的

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。さらにこの IpaH ファミリータンパクは赤痢菌をはじめ、サルモネラ属細菌、エルシニア属細菌といった多くの病原細菌に複数個保存されていることから、感染における重要性が示唆される。E3 リガーゼ活性を有することから、IpaH ファミリータンパクは赤痢菌感染により活性化される様々なシグナル伝達経路の因子を標的とし、その E3 ユビキチンリガーゼ活性により標的分子のユビキチン化修飾し、シグナル伝達攪乱すると推測されるが、その詳細な機構は明らかになっていない。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の個々の感染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の包括的機能解析において、本研究では、(1) 個々の IpaH ファミリータンパクの宿主標的因子の探索、(2) IpaH-宿主標的因子相互作用解析、(3) 動物感染実験による IpaH ファミリータンパク機能の検証、の 3 点を遂行した。

(1) 個々の IpaH ファミリータンパクの宿主標的因子の探索

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

赤痢菌野生株、*ipaH* 遺伝子欠損株および *ipaH* 補填株を用いて、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サイトカイン産生量 (ELISA 測定)、mRNA 発現量 (リアルタイム PCR 解析)、病理解析により確認した。

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- κ 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- κ 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 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- κ 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- κ B 経路を特異的に抑制することから、DAG-PKC-NF- κ B 経路における IpaH0722 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- κ B 活性化を阻害、炎症反応を抑制することが示された

また、別の IpaH ファミリーエフェクターである IpaH5 は、宿主 DNA 認識機構による自然免疫応答に対抗するため、自身の E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的にシグナル因子である X をユビキチン化、タンパク分解へと導くことで I 型インターフェロン活性化を抑制することを明らかにした。

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 & Sasakawa C. *Shigella* IpaH family effectors as a versatile model for studying pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* 5, 100 (2016). 査読有
doi: 10.3389/fcimb.2015.00100

2. Ashida H, Mimuro H, & Sasakawa C. *Shigella* manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific roles. *Front Immunol.* 6, 219 (2015). 査読有
doi: 10.3389/fimmu.2015.00219

3. Ashida H, Kim M, & Sasakawa C. Exploitation of the host ubiquitin system by human bacterial pathogens. *Nature Review Microbiol.* 12, 399-413 (2014). 査読有
doi: 10.1038/nrmicro3259.

4. Ashida H, & Sasakawa C. *Shigella* hacks host immune responses by reprogramming the host epigenome. *EMBO Journal.* 33, 2598-2600 (2014) 査読有
doi: 10.15252/embj.201489934

5. Ashida H, Kim M, & Sasakawa C. Manipulation of the host cell death pathway by *Shigella*. *Cellular Microbiology.* 16, 1757-1766 (2014) 査読有

doi: 10.1111/cmi.12367

6. Suzuki S, Mimuro H, Kim M, Ogawa M, Ashida H, Toyotome T, Franchi L, Suzuki M, Sanada T, Suzuki T, Tsutsui H, Núñez G, & Sasakawa C. *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, E4254-4263 (2014). 査読有

doi: 10.1073/pnas.1324021111

7. Ashida H, Nakano H, & Sasakawa C. *Shigella* IpaH0722 E3 ubiquitin ligase effector targets TRAF2 to inhibit PKC-NF- κ B activity in invaded epithelial cells. *PLoS Pathogens.* e1003409 (2013). 査読有
doi: 10.1371/journal.ppat.1003409.

8. Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, Mimuro H, Kim M, Ashida H, Akakura R, Yoshida M, Kawalec M, Reichhart JM, Mizushima T, Sasakawa C. The *Shigella* OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection.

Cell Host Microbe. 13, 570-583 (2013).

査読有

doi: 10.1016/j.chom.2013.04.012.

[学会発表](計 5 件)

1. 発表者: Hiroshi Ashida & Chihiro Sasakawa

発表演題 : *Shigella* manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific roles. (国際学会、招待講演)

学会名 : The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity

発表年月日 : 2015年9月11日

発表場所 : 淡路島夢舞台 (兵庫県淡路島)

2. 発表者 : Hiroshi Ashida & Chihiro

Sasakawa

発表演題 : *Shigella* manipulates host immune responses by delivering IpaH effector (国際学会、ポスター発表)

学会名 : COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES, Suzhou, China

発表年月日 : 2015年11月4日

発表場所 : Suzhou, China

3. 発表者 : Hiroshi Ashida & Chihiro

Sasakawa

発表演題 : *Shigella* effector protein hacks host immune responses by targeting type I interferon signaling. (ポスター発表)

学会名 : 第88回 日本細菌学会総会

発表年月日 : 2015年3月28日

発表場所 : 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)

4. 発表者 : Hiroshi Ashida & Chihiro

Sasakawa

発表演題 : *Shigella* effector protein exploits host ubiquitin system (口頭発表 & ポスター発表)

学会名 : 第3回感染症若手フォーラム

発表年月日 : 2014年2月14日 ~ 15日

発表場所 : やすらぎ伊王島 (長崎県長崎市)

5. 発表者 : 芦田 浩、笹川 千尋

発表演題 : 赤痢菌エフェクターによる宿主細胞の機能攪乱 (シンポジウム口頭発表)

学会名 : 第87回 細菌学会総会

発表年月日 : 2014年3月26日

発表場所 : タワーホール船堀 (東京都江東区)

〔図書〕(計 1 件)

1. 芦田 浩、笹川 千尋 「赤痢菌感染分子基盤戦略の解明」、感染・炎症・免疫、vol. 43、p135-144、2013.

〔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・特任准教授

研究者番号 : 10535115

研究者番号 :

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :