

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460531

研究課題名(和文) 腸炎ピブリオエフェクターVopQによるカスパーゼ-1活性化抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of caspase-1 activation inhibition mechanism by *Vibrio parahaemolyticus* effector VopQ

研究代表者

比嘉 直美 (HIGA, Naomi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・技術専門職員

研究者番号：70457688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸炎ピブリオのエフェクタータンパクVopQはマクロファージのインフラマソームによるカスパーゼ-1の活性化を阻害する。その機序を明らかにするために、VopQの宿主細胞内標的分子の探索およびオートファジー誘導とインフラマソーム活性化阻害との関連について検証した。結果として、VopQの宿主細胞内標的分子は細胞接着因子Afadinが候補にあがったが、マクロファージ内での相互作用は認められなかった。また、オートファジー誘導との関連について、研究期間中に十分な検証が得られなかったが、貪食細胞特異的に発現するATG5コンディショナルノックアウトマウスが出来たので、今後の研究での活用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The effector protein VopQ of *Vibrio parahaemolyticus* is known to inhibit the activation of caspase-1 in macrophage inflammasome. I attempted to clarify the relationship between autophagy induction and inflammasome activation inhibition, searching for target molecules for VopQ in host cells. As a result, the cell adhesion factor Afadin was a candidate the target molecule for VopQ, but interaction in macrophages was not observed. In addition, I could not identify such concerning the relation with autophagy, during this research period, but ATG5 conditional knockout mouse expressing specifically on phagocytic cells was made, so it can be expected to be utilized in future research.

研究分野：細菌学

キーワード：マクロファージ インフラマソーム 感染防御

1. 研究開始当初の背景

腸炎ビブリオは細胞外増殖性細菌であり、主な病原因子として耐熱性溶血毒 (Thermostable direct hemolysin: TDH) および 2 種類の III 型分泌装置 (Type 3 secretion system-1 および -2 : T3SS-1、T3SS-2) を有する。III 型分泌装置 (T3SS) は多くのグラム陰性細菌にみられる特殊なタンパク質分泌装置で、エフェクターと総称されるタンパク質を宿主細胞に直接注入し、様々な作用を引き起こすことによって感染を成立させると考えられている。

一方、細菌の感染に伴いマクロファージ等の自然免疫系細胞は、菌を排除するための防御システムを作動させる。その中でもカスパーゼ-1 (別名インターロイキン-1 β 変換酵素) は、細胞内で活性のない前駆体 (プロカスパーゼ-1) として存在し、Nod 様受容体 (NOD-like Receptor, NLR) の NLRP3 や NLRC4 といった分子と、アダプタータンパク質 ASC およびプロカスパーゼ-1 からなるタンパク質複合体 (インフラマソーム) を形成し、カスパーゼ-1 活性化を制御することが明らかになっている。活性化したカスパーゼ-1 は IL-1 β 、IL-18 の前駆体 (それぞれ proIL-1 β 、proIL-18) を切断して成熟型へ変換し、細胞外への分泌を促す役割を担っている (図 1)。

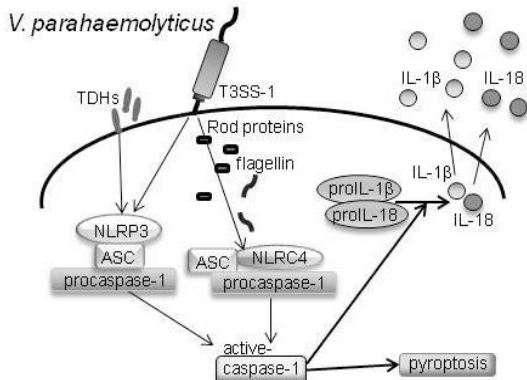


図 1. 腸炎ビブリオによるカスパーゼ-1 活性化

申請者らは腸炎ビブリオがマクロファージに感染すると、病原因子である TDH は NLRP3 によって、また T3SS-1 は NLRP3、NLRC4 両方にそれぞれ認識されることで、インフラマソームが活性化することを報告した。さらに、T3SS-1 により分泌されるエフェクタータンパクの 1 つ VopQ を欠損した株をマクロファージに感染させると、野生株感染時に比べて NLRC4 インフラマソームを介したカスパーゼ-1 の活性化が特異的に増強されることを発見した (図 2)。

つまり、腸炎ビブリオは VopQ を使って NLRC4 インフラマソームによるカスパーゼ-1 の活性化を阻害していることが明らかとなった (Higa *et al.* PLoS Pathog, 2013)。これまでに、VopQ がオートファジーを誘導するという報告があるが (Burdette *et al.* Mol Microbiol, 2009)、VopQ によるオートファジ

ー誘導とインフラマソーム活性化阻害との関連は明らかではなかった。現在、VopQ の宿主細胞内標的分子は不明であり、本菌が宿主個体に感染した時の病態発症における VopQ の役割も全く不明であった。

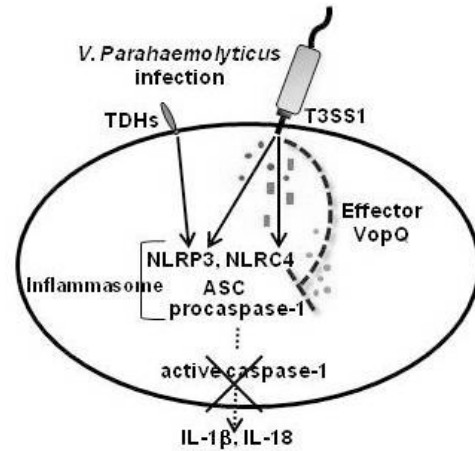


図 2. T3SS-1 より分泌されるカスパーゼ-1 活性化抑制因子、VopQ

2. 研究の目的

感染性食中毒の起原因菌である腸炎ビブリオがマクロファージに感染すると、菌側の病原因子によって宿主細胞内のカスパーゼ-1 が活性化され、炎症性サイトカインの産生と細胞死が誘導される。その一方で、腸炎ビブリオは VopQ と呼ばれるエフェクタータンパク質を宿主細胞内に注入してカスパーゼ-1 の活性化を阻害していることが、申請者らの研究によって明らかとなった。しかしながら、この一見矛盾する現象の詳細はわかってない。そこで本研究では、VopQ によるカスパーゼ-1 の活性化阻害機構、および個体レベルでの感染過程におけるその役割について明らかにする。具体的には VopQ の宿主細胞内標的分子の探索を行い、その相互作用を明らかにすること、およびオートファジー誘導とインフラマソーム活性化阻害との関連について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、腸炎ビブリオ RIMD2210633 株 (臨床分離株) を使用し、耐熱性溶血毒 (TDH) 欠損株を親株として各種病原因子欠損株を作製し実験に使用した。宿主として C57BL/6 マウスおよび C57BL/6 マウスを遺伝的背景とするカスパーゼ-1、ASC、NLRP3、NLRC4、NAIP5、IL-1 β 、IL-18 などの遺伝子欠損マウス、NLRP3 および NLRC4 二重欠損マウス、ATG5 コンディショナルノックアウト (部位特異的欠損) マウス等を使用した。

<計画 1> VopQ によるカスパーゼ-1 活性化抑制とオートファジーの関連を明らかにする

オートファジーに必須の遺伝子 ATG5 の全身欠損マウスは生後まもなく死亡するため、Cre/loxP システムを用いたコンディショナ

ルノックアウトマウスを利用する。Lys2-Creの系を用いて貪食細胞特異的 ATG5 コンディショナルノックアウトマウスを作製する。この ATG5 コンディショナルノックアウトマウスから骨髓を採取して分化させたマクロファージ細胞に腸炎ビブリオ親株と VopQ 遺伝子欠損株を感染させ、カスパーゼ-1 活性化および IL-1 β 、IL-18 の産生を解析する。パイロプトーシスの確認は細胞死によって細胞外に排出される LDH (lactose dehydrogenase) 酵素の測定によって評価する。

<計画 2> VopQ の宿主細胞内標的分子を同定し、カスパーゼ-1 活性化抑制機構を解析する
酵母 two-hybrid スクリーニングで相互作用する宿主側標的分子の同定を試み、スクリーニングを行った結果、有望な候補クローン X が分離された (図 3)。

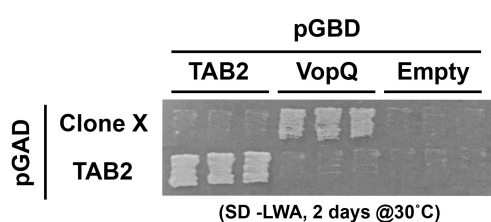


図 3. Two-hybrid 法による VopQ と X の特異的な結合。TAB2 はアッセイのコントロール。

このクローン X の全長のクローニングと塩基配列を決定する。

VopQ の宿主細胞内標的分子が同定されたら、VopQ と宿主細胞内標的分子が会合した時に、NLRC4 インフラマソームへどのような影響を与えるか調べる。これまでの結果から、VopQ によるカスパーゼ-1 活性化抑制は NLRP3 には影響がなく NLRC4 のインフラマソームを形成した後のカスパーゼ-1 活性化への影響が確認されている。感染時に当該標的分子の抗体を用いて、細胞免疫染色等を行い評価する。また可能であれば、同定した標的分子の遺伝子欠損マウス由来の細胞、あるいは遺伝子ノックダウン法により、当該分子が VopQ による NLRC4 インフラマソーム抑制に関わるかどうか検証する。

<計画 3> 生体内でのエフェクターの機能を評価する為に、マウス感染モデルを作製する

腸炎ビブリオはヒト以外の動物で自然経口感染成立が難しく、これまでマウス経口自然感染モデルはなかった。しかし、2012 年に Whitaker らが事前にストレプトマイシンを投与したマウスにストレプトマイシン自然耐性菌を感染させるマウス感染モデルを報告した (Whitaker *et al.* Infect Immun, 2012)。このモデルを用いて、野生株と VopQ 欠損株のそれぞれのストレプトマイシン自然耐性菌をマウスに経口感染させた後、下痢の有無、腸管上皮の損傷および炎症細胞の浸潤、血中または局所のサイトカイン産生、あるいは生着菌数などを、それぞれ組織染色、ELISA 法/RT-PCR 法、培養法などを用いて調べる。

4. 研究成果

<計画 1> VopQ によるカスパーゼ-1 活性化抑制とオートファジーの関連を明らかにする

VopQ とオートファジーの関連性については、マウスマクロファージの野生型細胞と NLRP3 欠損細胞を用いて、腸炎ビブリオ親株と VopQ 欠損株を感染させた時に、LC3-I から LC3-II への移行をウエスタンブロットで確認してオートファジーが誘導されているかを検討した。その結果、明らかに、VopQ 欠損株では LC3-II への移行が認められず、オートファジーが誘導されなかったため、VopQ が何らかのオートファジー誘導に関連しているのではないかと思われた。しかし、腸炎ビブリオ親株感染時にエンドソーム酸性化を抑制することでオートファジー阻害作用のあるパフィロマイシン A1 を添加して同様に LC3-II への移行が阻害されるかどうかをみたが、結果として LC3-II への移行が見られオートファジーが阻害されないことがわかった。このことは、カスパーゼ-1 活性化に直接オートファジーが関連するのかが疑問を残すことになった。そこでオートファジーを制御した状態でカスパーゼ-1 活性化が見られるかどうかを確認するために、ATG5 遺伝子をノックアウトさせたマウスの作成に取り掛かった。始めに ATG5 floxed マウスを購入し、Lys2-Cre マウスとの交配によって、ATG5 flox/flox Lyz2-Cre マウスを作成した。Lyz2-Cre の系を用いることでマクロファージなど貪食細胞特異的に遺伝子欠損を発現する ATG5 コンディショナルノックアウトマウスを作製することができる。しかし、Lyz2-Cre マウスのバッククロスが十分でなかったために、初年度は実験に供することができず C57BL/6 マウスとのバッククロスを行いながら、ATG5 コンディショナルノックアウトマウスの作製に 2 年半を要してしまった。最終年度に目的の ATG5 コンディショナルノックアウトマウスが得られたので、当初予定していた実験を行った。

ATG5 コンディショナルノックアウトマウス由来のマクロファージに、腸炎ビブリオ親株と VopQ 欠損株を感染させたところ、LC3-I から LC3-II への移行は見られなかった。

カスパーゼ-1 の活性化の検証では腸炎ビブリオ親株感染で、野生型マウス由来マクロファージと比較してオートファジー欠損マウス由来マクロファージでカスパーゼ-1 活性化が減弱していたが、感染時間など検討すべき点も残っており、研究期間中に目的とする研究結果が得られたとは言えなかった。

また、これまでの実験では VopQ はマクロファージの NLRC4 経路でカスパーゼ-1 活性化抑制がみられたので、NLRC4 または NAIP5 の関与が示唆された。NLRC4 と NAIP5 単独欠損マウスでの検証も行ったが、NLRC4 または NAIP5 と NLRP3 二重欠損マウスの作成までには至らなかったため、どの経路で VopQ が関与しているかの結論には至らなかった。

<計画 2> VopQ の宿主細胞内標的分子を同定し、カスパーゼ-1 活性化抑制機構を解析する

酵母 two-hybrid スクリーニングで VopQ に相互作用する宿主側標的分子クローン X の解析を行った結果、細胞膜構成成分で細胞接着に関与する Afadin と同定された。Afadin は細胞間のタイトジャンクションに存在し、細胞接着に関与する細胞構成成分である。

マウス骨髄細胞由来のマクロファージにおける Afadin の局在を確認する為に Afadin 抗体を用いて免疫染色をした結果 (図 4)、野

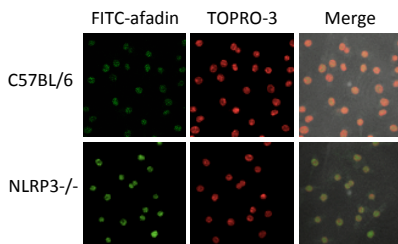


図4. マクロファージのAfadin染色

生型マクロファージと NLRP3 欠損マクロファージの両方とも核内 (TOPRO-3: 赤色) で Afadin 抗体に反応して FITC (緑色) が光っているのが確認された。特に、NLRP3 欠損マクロファージでは野生型よりも強く光っているように見えた。本来 Afadin タンパクは細胞間の接着に関与するので、核内での機能は不明である。

次に細胞間構成成分としての Afadin と腸炎ビブリオ感染時の相互作用を確認する為に、マウス大腸細胞 CMT93 やヒト大腸がん細胞 Caco2 を用いて腸炎ビブリオの親株と VopQ 欠損株を感染させて、Afadin の局在を免疫染色で確認し、細胞の状態を観察した (図 5)。

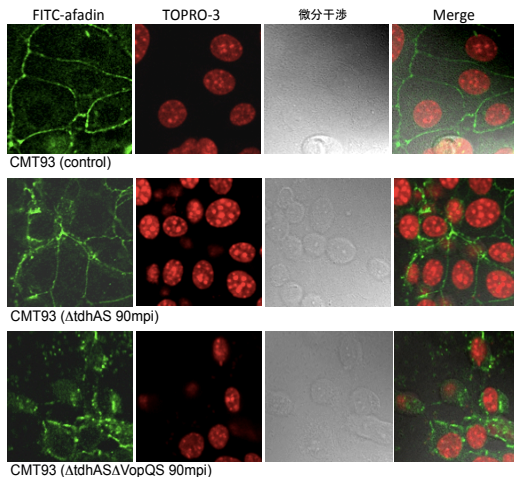


図5. CMT93 細胞に腸炎ビブリオ親株と VopQ 欠損株を感染させ 90 分後に固定して Afadin 抗体で免疫染色した。

感染後 90 分までは親株では細胞がコントロール株とほぼ同様であったが、VopQ 欠損株では細胞のタイトジャンクションが崩れて、細胞が破壊されていく様子が見られた。しかし、120 分以上になると、親株でも細胞の破壊が見られたので、これだけでは VopQ と Afadin との相互作用はわからなかった。

<計画 3> 生体内でのエフェクターの機能を評価する為に、マウス感染モデルを作製する

マウスでは腸炎ビブリオの経口感染モデルの感染成立が難しいが、生体内でのエフェクタータンパクの機能を評価するために動物感染モデルは重要である。

マウス炎症モデルとして、腸炎ビブリオのストレプトマイシン自然耐性株を作製し、ストレプトマイシン前投与群 (コントロールとして PBS 前投与群) に経口的に胃ゾンデを用いて腸炎ビブリオを感染させた。菌感染 48 時間後にマウスの腸管内炎症を解析するため小腸、大腸、盲腸に分けてそれぞれの半分を菌数確認、残り半分を切片作製に用いた。

菌数は PBS 前投与した群では検出限界以下で菌の検出はできなかったが、ストレプトマイシン前投与群では、常在菌の発育が抑えられたことで、接種された腸炎ビブリオが回収された。部位別に分けると小腸より盲腸の部分で菌数が多い結果となった (図 6)。

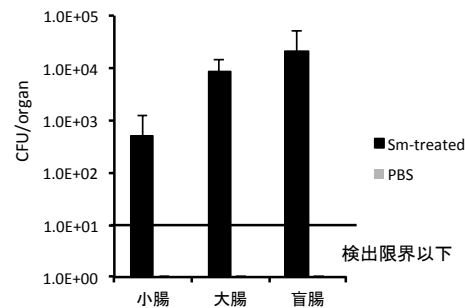


図6. ストレプトマイシン前投与群と非投与群で腸炎ビブリオを経口投与した時に回収された菌数

小腸、大腸、盲腸の3つのパートの残り半分はホルマリン固定後、凍結切片作製を行った。切片は腸炎ビブリオの菌体を検出するために外膜タンパク O3 抗原に対する抗体、免疫細胞の集積を見るために CD4、CD11b や F4/80 抗体等を用いた免疫染色、および組織学的、病理学的に解析するため HE 染色を行って評価した。

結論として、腸炎ビブリオを感染させる前にストレプトマイシンを前投与することで、菌の感染が成立し、免疫細胞が感染後時間経過とともに増加して見られたので、マウスモデルとして使用できると考えられた。今回は野生型腸炎ビブリオでの感染結果であるが、VopQ 欠損株で感染させた時の評価が今後確認できる。

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 6 件)

①. Nakasone N, Higa N, Toma C, Ogura Y, Suzuki T, Yamashiro T. Epigallocatechin gallate inhibits the type III secretion system of gram negative enteropathogenic bacteria under model condition. FEMS Microbiol Lett. 2017. 査読有, (in press)

https://mc.manuscriptcentral.com/downloads/linkpool/prod1/femsle/2017/3/s1-ln26781754-611741896-1939656818Hwf1670609807IdV2378423526781754PDF_HI0001.pdf

②. Nakasone N, Ogura Y, Higa N, Toma C, Koizumi Y, Suzuki T, Yamashiro T. Hot-PBS Extract of *Vibrio vulnificus* Induces NF- κ B Activation. *Electronic J. Biol.* 13: 131-134, 2017. 査読有, (in press) <http://ejbio.imedpub.com/hotpbs-extract-of-vibrio-vulnificus-induces-nfb-activation.pdf>

③. Sai K, Morioka S, Takaesu G, Muthusamy N, Ghashghaei HT, Hanafusa H, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 determines susceptibility to endoplasmic reticulum stress and leptin resistance in the hypothalamus. *J Cell Sci.* 129: 1855-1865, 2016. 査読有, DOI: 10.1242/jcs.180505.

④. 鈴木敏彦, トーマ・クラウディア, 高江洲義一, 比嘉直美, 仲宗根昇. 病原細菌の感染と宿主応答の分子論-細菌感染によるインフラマゾーム活性化機構およびレプトスピラの持続感染機構-, 化学療法の領域, 医薬ジャーナル社, 32: 291-296, 2016. 査読無, https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=30975.

⑤. Mihaly SR, Morioka S, Ninomiya-Tsuji J, Takaesu G. Activated macrophage survival is coordinated by TAK1 binding proteins. *PLOS ONE*, 9, 2014. 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0094982.

⑥. Morioka S, Broglie P, Omori E, Ikeda Y, Takaesu G, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 kinase switches cell fate from apoptosis to necrosis following TNF stimulation. *J Cell Biol*, 204: 607-23, 2014. 査読有, DOI: 10.1083/jcb.201305070.

[学会発表] (計 8 件)

①. Claudia Toma, 山口孝治, 比嘉直美, 松本亜里奈, 大倉信彦, 仲宗根昇, 鈴木俊彦, 山城哲: Interaction of virulent *Leptospira interrogans* with renal epithelial cells. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台国際センター (宮城県仙台市), 3/19-21, 2017.

②. 仲宗根昇, 比嘉直美, 山口孝治, トーマ・クラウディア, 山城哲: エピガロカテキンゲレート (EGCG) による細菌 III 型分泌装置阻止機構の解明. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台国際センター (宮城県仙台市), 3/19-21, 2017.

③. 山口孝治, トーマ・クラウディア, 比嘉直美, 仲宗根昇, 山城哲: 病原性レプトスピラの腎臓内における長期感染のメカニズム解明. 第 69 回日本細菌学会九州支部総会, 宮崎市民プラザ (宮城県宮崎市), 9/1-2, 2016.

④. 仲宗根昇, 比嘉直美, トーマ・クラウディア, 高江洲義一: エピガロカテキンゲレートによる細菌の III 型分泌機構の阻止. 第 68 回日本細菌学会九州支部総会, 別府国際コンベンションプラザ・ビーコンプラザ (大分県別府市), 9/4-5, 2015.

⑤. 仲宗根昇, 比嘉直美, Claudia Toma, 高江洲義一, 鈴木敏彦: グアバ葉抽出液による III 型分泌タンパク EspB の分泌阻害機構. 第 88 回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市), 3/27, 2015.

⑥. Takaesu Giichi, Nakasone Noboru, Toma Claudia, Higa Naomi, Suzuki Toshihiko: TAK1-binding protein 2 (TAB2) negatively regulates the processing of pro-interleukin-1 β . 第 44 回日本免疫学会総会 (ワークショップ), 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 11/18-20, 2015.

⑦. 仲宗根昇, 比嘉直美, Claudia Toma, 高江洲義一, 野原敏次, 鈴木敏彦: 沖縄近海からとれた海洋産物による細菌の III 型分泌機構阻害. 第 87 回日本細菌学会総会, タワーホール船堀 (東京都江戸川区), 3/26-28, 2014.

⑧. 仲宗根昇, 比嘉直美, トーマ・クラウディア, 高江洲義一, 野原敏次, 鈴木敏彦: 病原細菌の 3 型分泌機構を阻止する植物の探索. 第 67 回日本細菌学会九州支部総会, 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市), 9/5-6, 2014.

[その他]

ホームページ等

<http://bacteriology-u-ryukyuu.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

比嘉直美 (HIGA, Naomi)
琉球大学・医学研究科・技術専門職員
研究者番号: 70457688

(2) 研究分担者

高江洲義一 (TAKAESU, Giichi)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授
研究者番号: 60403995

(3) 連携研究者

鈴木敏彦 (SUZUKI, Toshihiko)
東京医科歯科大学・歯学総合研究科・教授
研究者番号: 10292848