

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860283

研究課題名(和文) NAIPsによる赤痢菌認識機構

研究課題名(英文) Recognition machinery of Shigella by NAIPs.

## 研究代表者

鈴木 志穂 (Suzuki, Shiho)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：80444074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はNAIPsに着目し、非鞭毛性病原細菌である赤痢菌感染モデルを用いて、赤痢菌感染が引き起こすインフラマソーム活性化においてNAIPsがどのように関与するのか明らかにすることを目的として実験を行った。その結果、赤痢菌の型分泌装置を構成するinner rod proteinであるMxiIがNAIP2による認識を受け、NLRC4インフラマソーム活性化を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Shigella are bacterial pathogens that are the cause of bacillary dysentery. An important feature of Shigella is their ability to invade the cytoplasm of host epithelial cells and macrophages. A major component of host recognition of Shigella invasion is the activation of the inflammasome, a molecular platform that drives the activation of caspase-1 in macrophages. Although Shigella is known to induce the activation of the Nlrc4 inflammasome, the mechanism by which the bacterium activates Nlrc4 is largely unknown. We discovered that the Shigella T3SS inner rod protein MxiI induces Nlrc4 inflammasome activation through the interaction with host Naip2, which promoted the association of Naip2 with Nlrc4 in macrophages. Expression of MxiI induced caspase-1 activation, Asc oligomerization, pyroptosis and IL-1b release which required Naip2, but not Naip5. This study elucidates the microbial-host interactions that drive the activation of the Nlrc4 inflammasome in Shigella-infected macrophages.

研究分野：細菌感染と免疫

キーワード：inflammasome 赤痢菌 NAIP NLRC4

## 1. 研究開始当初の背景

赤痢菌、サルモネラ菌などの病原細菌の感染に対し、宿主は菌体をマクロファージに取り込んだ後、菌体由来分子を認識して NLR4 をはじめとする inflammasome の活性化を誘導し、炎症性サイトカイン IL-1、IL-18 の産生・分泌を上昇させ、最終的に激しい炎症応答を引き起こす。サルモネラ菌では NLR4 が主に鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンを特異的に認識して激しい炎症応答を引き起こすことが知られているが、赤痢菌のように鞭毛を持たない病原細菌も存在しており、NLR4 がどのようにしてこれら非鞭毛性病原細菌を認識することができるのかわかっておらず、研究命題とされてきた。本研究にて焦点をあてている病原細菌の感染に伴い誘導される inflammasome 活性化とその結果引き起こされる炎症応答については、その免疫誘導における重要性から世界各地の研究グループで盛んに研究されているが、相反する研究報告が乱立している混乱現状であり、未だ体系的な知識基盤の確立には至っていない。サルモネラ菌感染モデルによる研究例では、菌体の鞭毛を構成するフラジェリンタンパク質、および PrgJ(病原性エフェクターを分泌する型分泌装置の inner rod protein)が宿主の NLR4 により認識され、inflammasome 活性化のトリガーとなることが報告されている(Franchi et al., 2006, Nature; Miao et al., 2010 PNAS; Franchi et al., 2012, Nature immunology)。NLR4 が認識するリガンドとなる分子にはわかりやすい共通点がある訳ではなく、NLR4 がどのようにしてこれらを特異的に認識するのかわかっていない。また、NLR4 とトリガー分子との間の直接結合は当時確認されておらず、これらを介する未知の因子の存在が示唆されていた。2011年に、アメリカと中国の研究チームがほぼ同時にこれらの謎に対する鍵となる分子を特定した(Kofoed and Vance, 2011, Nature; Zhao et al., 2011, Nature)。それが NAIP ファミリータンパク質である。上述の2論文は、NAIP5 がフラジェリンに、NAIP2 が PrgJ に対しそれぞれ結合し、これらの NAIPs-リガンド複合体は NLR4 とともに高分子複合体を形成し、inflammasome の活性化を引き起こすと提唱している。報告例はサルモネラ菌モデルのみにとどまることから未だわかっていない部分が多いが、しかしながら、これらの報告から興味深い1つの仮説が推測された。それは、それぞれの NAIP ファミリータンパク質が異なる細菌リガンドに対して結合能を有し、inflammasome 活性化を誘導するためのアダプターとして役割を担っているのではないかという仮説である。2011年の2報の論文(Kofoed and Vance, 2011, Nature; Zhao et al., 2011, Nature)はその後の反響が大きく、国際的な研究ネットワーク上でも盛んに議

論されていることから、NAIPs タンパク質の分子機構やその役割について解明するための国際競争は今後激化していくものと予測された。

前述のとおり本研究開始当初は、赤痢菌をはじめとする非鞭毛性病原細菌では、NLR4 がどのようにして病原体の感染を認識できるのか、その分子レベルでの認識機構については明らかにされていない部分が多かった。我々は、赤痢菌を感染モデルとして用い、NAIPs ファミリータンパク質が病原細菌由来の分子を認識する分子機構を明らかにすべく、inflammasome を誘導する病原細菌由来分子の特定、次に特定した細菌由来のトリガーにより活性化される inflammasome pathway の特定、および NAIP 経路の特定、更に細菌リガンドと NAIPs 間の結合特異性を明らかにするための研究を実施した。

## 2. 研究の目的

赤痢菌のような非鞭毛性病原細菌では、inflammasome 活性化時の分子レベルでの認識機構についてわかっていない部分が多い。本研究では、inflammasome 活性化時において、病原細菌由来の分子と NLR4 が複合体形成するためのアダプターとして機能することが示唆されている NAIPs ファミリータンパク質に着目し、赤痢菌を感染モデルとして研究を行い、NAIPs ファミリータンパク質と赤痢菌由来分子との相互作用解析から NAIPs による赤痢菌認識機構を明らかにし、次に NAIPs によるリガンド認識特異性決定の機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究計画では、非鞭毛性病原細菌である赤痢菌を感染モデルに用い、はじめに inflammasome を活性化する赤痢菌の菌体由来タンパク質のスクリーニングを行う。同時に、特定した細菌由来のトリガーにより活性化される経路は NLR4 inflammasome 経路であるのか検証し、違う場合はどの経路によるものかを特定する。さらに、赤痢菌トリガー分子と NLR の間を仲介する NAIP を特定する。そして、細菌由来リガンドと NAIPs 間の結合能をはじめとする特異性を検証する。具体的には以下に示す実験計画に従い実験を行った。

### (1) NLR4 inflammasome 活性化を誘導する細菌リガンドの特定

これまでの我々の研究より、トリガーとなるリガンドの特定にはレトロウイルス発現ベクターと nucleofector を用いたマクロファージ発現系を利用するのが非常に効果的であったことから、本手法を用い inflammasome の活

性を誘導する赤痢菌分泌エフェクター分子をスクリーニングする。ここでは、赤痢菌の型分泌装置を構成する構造タンパク質の遺伝子、赤痢菌が型分泌装置を用いて菌体外に分泌する一連のエフェクター遺伝子を発現ベクターに組み込み、WT BMDMs(骨髄マクロファージ)及び、NLRC4-KO BMDMs内にて発現させ、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による観察とLDHアッセイ、ELISA解析等の手法を併用してpyroptosis誘導能を検証する事により、各エフェクターのinflammasome triggerとしての活性を検証する。本実験では、NLRC4-KOマウス由来のBMDMsをコントロールとして用いることにより、リガンドが活性化しているのはNLRC4 inflammasome経路であるのかを検証する。NLRC4以外の経路であることが示唆された場合には、一連のNLRsのノックアウトマウスを入手して、同様の実験を行うことにより、活性化されている経路を特定する。Inflammasome 関連のノックアウトマウスは、共同研究先であるミシガン大学 Nunez Labにリクエストして、マクロファージ分化誘導用のstem cellを入手する。以上の過程により inflammasome を誘導する赤痢菌由来の分子を特定する。

## (2) in vitro 赤痢菌感染実験

(1)の実験により特定したinflammasome triggerを欠失した赤痢菌変異株を、Red recombinase法及び pCACTUS 法を用いて作成する。さらに、得られた欠失変異体に、標的遺伝子を導入したプラスミド遺伝子補完株及びゲノム遺伝子補完株を作成する。これら作成した変異株に赤痢菌野生株と型分泌装置が機能しない赤痢菌変異株(S325)を加え、赤痢菌感染実験に供する。各種赤痢菌株をBMDMsに感染させ、inflammasome活性を検証することにより、特定した赤痢菌由来部分分子がinflammasome活性に必須であるか確認する。分化誘導後のBMDMsにLPS刺激を与えて活性化させた後に赤痢菌を感染させ、感染30分から3時間後までのタイムコースをとり、培養上清を回収する。inflammasome活性化を検証する方法としては、IL-1 $\beta$ 、IL-18をはじめとする各種サイトカインのELISA測定、LDHアッセイ、プロセシングされたCaspase-1活性体(P20)のウエスタン解析による検出を行う。さらに、(1)の実験により特定した赤痢菌由来の分子を、Caspase-1-KOマクロファージ内で発現させ、inflammasome活性に対する影響をみる。これらの過程により、特定した赤痢菌由来の分子がどのinflammasome経路を活性化しているのかを特定する。

## (3) 細菌リガンドとNAIPs間の結合特異性の検証

NAIPファミリータンパク質の全長cDNAクローンを作成または入手し、主に免疫沈降

法により、特定したリガンドとNAIPsとの結合特異性を検証する。以上の過程により、赤痢菌リガンドとNAIPsファミリータンパク質間の結合特異性についての仮説を検証する。

## (3) 赤痢菌感染により引き起こされる inflammasome活性化に対するNAIPの影響の検証

NAIPsのshRNA/siRNAノックダウン解析により、赤痢菌感染時に誘導されるinflammasome活性化に対する、各NAIPの影響を観察する。各種 NAIPsノックアウトマウスの入手は難しいため、本過程はsiRNAまたはshRNA を用いたノックダウンにより実験を行う。マクロファージを対象としたトランスフェクションは技術的に難しく、まずはマクロファージに対し最も効果的なノックダウン効果を発揮する実験系の選定と条件検討から行う。はじめにNAIPsの発現を抑制するための siRNAを合成する。同時にshRNAレトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターの構築を行う。これらの過程により準備した各種 siRNA/shRNAをマクロファージにトランスフェクションし、そのノックダウン効率を確認する。トランスフェクション法に関しては、nucleofector, Dharmafect,各種トランスフェクション試薬など幾つかの手法を試し、最も高いノックダウン効果が得られた手法を実験に用いる。このような過程で、マクロファージに対し各 NAIPsファミリータンパク質のノックダウン処理を行い、赤痢菌を感染させ inflammasome 活性の状態を LDH 測定、Caspase-1 P20のウエスタン解析、ELISA によるサイトカイン測定により検証する。同時にNAIPsノックダウン細胞に対し、特定した赤痢菌トリガー分子を過剰発現させて、その影響をみる。また、inflammasome複合体は細胞内において1つの大きな凝集構造をとると考えられているが、この可視化に成功した報告例はほとんどなく、本研究計画ではinflammasome複合体のイメージング解析を試みる。以上の過程により、赤痢菌感染時のinflammasome活性化に対する各NAIPの影響を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 赤痢菌MxiIがNLRC4 inflammasomeを活性化

はじめに、inflammasomeのトリガーとなる細菌由来リガンドを特定するためのスクリーニングを行った。赤痢菌が型分泌装置を構成する遺伝子及び型分泌装置を通じて菌体外に分泌される一連のエフェクター遺伝子を発現ベクターに組み込み、WT 骨髄マクロファージ(BMDMs)及び、NLRC4-KO BMDMs内にて発現させた。発現ベクターに組み込んだ各エフ

エクターがinflammasome triggerとしての活性を持つ場合、発現を示すタグであるGFP蛍光が認められると同時に、WT BMDMsにて pyroptosisによる細胞死が認められる一方でNLRC4-KO BMDMsでは細胞死が起こらない。判定方法として、第一次スクリーニングとして蛍光顕微鏡観察及びLDH測定により候補を絞り、第二次スクリーニングとしてIL-1 ELISA測定を行った。このようにしてスクリーニングを行った結果、Mxilを特定した。MxilをWT BMDMs内で発現させると大半のマクロファージが細胞死を引き起こし、生き残ったマクロファージでGFP蛍光を発するものは殆ど認められなかった。一方でNLRC4-KO BMDMsではGFP蛍光を呈するマクロファージは70%以上が生存していた。それぞれの培養上清中のIL-1値をELISAにより測定したところ、MxilをWT BMDMs内で発現させた場合においてのみ、IL-1値の上昇が認められた。以上のことはMxilがNLRC4経路依存的にinflammasomeを活性化させていることを示している。Mxilは赤痢菌の型分泌装置を構成する構造タンパク質であり、inner rod proteinとして型分泌装置基部の内側に位置する。分子量は約15kDa程度と小さく、細胞質中に露出しない構造タンパク質であるが、型分泌装置活性化時に菌体外への分泌が報告されており、エフェクター分泌時に巻き込まれるように細胞質中に漏れだしていると考えられている。当初の予定ではinflammasome triggerを欠失した赤痢菌変異株作出を計画していたが、Mxilの欠失変異体は型分泌装置のエフェクター分泌機能自体が失われてしまうことから実験に用いることができず、赤痢菌変異株を用いた感染実験は不可能であることから、代替の実験系を研究に用いることにした。

(2) Mxilは特異的にNAIP2と相互作用し、NAIP2-NLRC4と複合体を形成する

NAIP2及びNAIP5の全長cDNAクローンは、UCバークレーのRussell Vance博士より提供いただいた。Mxil、NAIP2及びNAIP5の全長cDNAクローンを発現ベクターに組み込み細胞内で共発現させ、免疫沈降により相互作用を検証した。その結果、Mxil-NAIP2間で共沈が認められた一方、Mxil-NAIP5間では認められなかった。さらにMxil-NAIP2-NLRC4の共沈が認められ、この3者が複合体形成することが示唆された。

(3) 赤痢菌はNAIP2依存的にinflammasomeを活性化する

赤痢菌感染時に引き起こされるinflammasome活性化に対するNAIPsの影響をノックダウン解析により検証した。はじめにNAIPsのノックダウンの実験系の確立を行った。マクロファージ細胞を用いたノックダウン系は技術的に難しく、十分なノックダウン

効率を得ることが難しいが、幾つかの手法を試み条件検討を重ねた結果、もっとも効果的な手法はnucleofectorを用いたsiRNAノックダウンであり、本手法を選択して実験を行った。NAIP2、NAIP5をターゲットとしたsiRNAを遺伝子ごとに合成し、同時にコントロールとしてnon-targeting siRNAを細胞にトランスフェクションした。このようにして得られたノックダウン細胞を赤痢菌野生株、及びS325に感染させ、誘導されるinflammasome活性化の状態を観察した。Caspase-1 P20のウエスタン解析によりCaspase-1活性化を確認したところ、NAIP2のノックダウンによりinflammasome活性化の顕著な低下が認められ、一方NAIP5ノックダウンではコントロールとの間に有為な差は認められなかった。この傾向はIL-1の値においても同様であった。次に、我々はASC重合体形成の観察を行った。これは、inflammasome活性化を引き起こしている細胞中には、ASC Pyroptosomeと呼ばれるASCの高次重合体構造が形成され、蛍光顕微鏡を用いたイメージング観察において通常1細胞あたり1つの大きなASCのスポットが観察される。我々の研究においても、赤痢菌感染細胞中にASCスポット形成が認められているが、NAIP2およびNAIP5ノックダウン細胞においてはASC重合体形成がどのように変化するかを観察した。NAIP2及びNAIP5ノックダウン細胞、コントロールとしてWT及びASC-KOマクロファージを赤痢菌に感染させ、ASC抗体を用いたイムノヒスト解析によりASC重合体形成を確認した結果、NAIP2ノックダウン細胞ではASC重合体形成の遅延が認められた。NAIP5ノックダウン細胞では遅延が認められず、むしろ逆に若干の促進傾向が認められた。同時に赤痢菌に感染した各細胞を経時的に回収し、架橋剤処理後、ASCの重合体形成をウエスタン解析により検証したところ、イメージング解析と同様の傾向が認められ、NAIP2依存的なASC重合化の促進が確認された。ASCの重合化はMxilを過剰発現させた細胞においても認められ、これはMxilがinflammasome活性化を誘導するtriggerであることを裏付けている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

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 USA* 111: E4254-E4263, 2014, 査読あり, DOI:10.1073/pnas.1324021111

Suzuki S, Franchi L, He Y, Muñoz-

Planillo R, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C, Núñez G. *Shigella* Type III Secretion Protein MxiI Is Recognized by Naip2 to Induce Nlr4 Inflammasome Activation Independently of Pkc . *PLoS Pathog* 10: e1003926, 2014, 査読あり, DOI:10.1371/journal.ppat.1003926

〔学会発表〕(計 11 件)

Shiho Suzuki, Luigi Franchi, Yuan He, Hitomi Mimuro, Chihiro Sasakawa, Gabriel Núñez, *Shigella* Type III Secretion protein MxiI Is Recognized by Naip2 to Induce Nlr4 Inflammasome Activation, 日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会日本側総会, 2014 年 8 月 7 日, 京都大学稲森財団記念館(京都府京都市)

Shiho Suzuki, Luigi Franchi, Yuan He, Hitomi Mimuro, Chihiro Sasakawa, Gabriel Núñez, *Shigella* Type III Secretion Protein MxiI Is Recognized by Naip2 to Induce Nlr4 Inflammasome Activation, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム in 奈良, 2014 年 9 月 23-26 日, 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

鈴木志穂, 病原細菌の感染機構および宿主免疫応答の解析, 公益財団法人アステラス病態代謝研究会研究報告会, 2014 年 10 月 18 日, 日本工業倶楽部 (東京都千代田区)

鈴木志穂, 三室仁美, 笹川千尋, Gabriel Nunez, 赤痢菌感染における Nlr4 inflammasome 活性化の機構, 第 97 回日本細菌学会関東支部総会, 2014 年 10 月 30 日, 東京ドームホテル(東京都文京区)

Shiho Suzuki, Hitomi Mimuro, Chihiro Sasakawa, Gabriel Núñez, *Shigella* MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25-27 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Shiho Suzuki, *Shigella* type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation, 49th U.S.-Japan Conference on Cholera and Other Enteric Bacterial Infections, Jan.14-16, 2015, Gainesville(USA)

鈴木志穂, 三室仁美, 小川道永, 芦田浩, 鈴木仁人, 真田貴人, 笹川千尋, *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin to activate inflammasomes, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 27-28 日, 長良川国際会議場 (岐

阜県岐阜市)

Shiho Suzuki, Hitomi Mimuro, Michinaga Ogawa, Hiroshi Ashida, Masato Suzuki, Takahito Sanada, Chihiro Sasakawa, *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes, 第 14 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2015 年 9 月 9-11 日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

Shiho Suzuki, *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes (selected for oral presentation), 第 14 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2015 年 9 月 10 日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

Hiroshi Ashida, Shiho Suzuki, Hitomi Mimuro, Chihiro Sasakawa, *Shigella* deploy multiple systems to modulate host innate immune responses, the Cold Spring Harbor Asia conference on Bacterial Infection and Host Defense, 2015 年 11 月 2-6 日, Suzhou(China)

鈴木志穂, 鈴木敏彦, 三室仁美, 笹川千尋, GLMN は細菌感染における inflammasome 活性化の negative regulator である, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 日, 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

〔その他〕

Berndt JD, *Shigella* Disables Defenses. *Sci Signal*, 7, ec283, 2014.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 志穂 (SUZUKI, Shiho)  
東京大学・医科学研究所・特任助教  
研究者番号: 80444074