

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04341

研究課題名(和文) 赤痢菌エフェクターによる新規標的タンパク質認識、感染機構の構造生物学的解析

研究課題名(英文) Structural biology of Shigella effectors to elucidate the molecular mechanisms of substrate recognition and infection

研究代表者

水島 恒裕 (MIZUSHIMA, TSUNEHIRO)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：90362269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢菌などの腸管系病原細菌は感染時にエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞に分泌し、宿主の持つ防御機構を妨げることで感染を拡大する。本研究では赤痢菌エフェクターによる宿主標的タンパク質の認識および感染メカニズムを構造生物学の手法を用いて解析し、赤痢菌OspIによる宿主ユビキチンリガーゼ阻害機構、IpaH9.8による基質認識機構を明らかにした。また、新規モチーフによりユビキチンリガーゼ活性を示すことが報告されたYopMの構造解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic bacteria such as Shigella, deliver a variety of virulence factors, called effectors, into host cells via the type III secretion system. These effectors mimic or hijack host proteins and modulate host signaling pathways to promote bacterial infection. To elucidate the molecular mechanisms of Shigella flexneri effectors such as OspI and IpaH9.8, we performed the structural and functional analyses of them. OspI deamidates Ubc13, thereby disrupting TRAF6 activation and dampening host inflammatory responses. IpaH9.8 and IpaH1.4 possessing E3 ligase activity, dampen the NF-kappaB-mediated inflammatory response. We determined the crystal structures of deamidated Ubc13 and substrate recognition domain of IpaH9.8. These structures provide the substrate recognition and inhibition mechanisms of immune response.

研究分野：構造生物学

キーワード：エフェクター X線結晶構造解析 ユビキチン修飾経路 赤痢菌 ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

腸管感染症による死者は発展途上国を中心に年間 100 万人以上にのぼると推定されており、近年は多剤耐性菌の出現により先進国においてもその感染が問題となっている。赤痢菌は粘膜上皮細胞を介して感染・定着し炎症性下痢を引き起こす病原体である。赤痢菌の感染は O157 やサルモネラ属、エルシニア属菌などと同様に、III 型分泌装置を通じてエフェクターと呼ばれる病原因子が宿主細胞に分泌されることで成立する。これらエフェクターに関する研究は国内、国外で積極的に行われており、これまでにオートファジー活性化を回避する働きを示す IcsB や宿主の炎症応答を抑制することで感染持続に寄与する IpaH ファミリーなどが報告されてきた。また、これら研究の中で、エフェクターの標的となる宿主タンパク質が新たに見出されている。しかし、原子構造に基づきエフェクターの機能発現機構を詳細に解析し、その反応機構より感染のメカニズムを示した研究は、一部のエフェクターについてのみであり、エフェクターの標的となる宿主タンパク質に対する認識、作用機構の解明は重要な課題であった。そこで、X 線結晶構造解析を中心とした構造生物学的手法を用いて解析を行うことにより、エフェクターの新たな感染機構及び反応機構の解明、その機能制御薬剤の開発を目指した。

2. 研究の目的

(1) OspI による NFκB 炎症応答阻害機構の解析

OspI は NFκB を介した炎症応答を活性化する役割を担う TRAF6 のユビキチン化反応を阻害するエフェクターである。OspI は TRAF6 の活性化に必要なユビキチン結合酵素 Ubc13 の 100 番目のグルタミン残基の側鎖を脱アミド化することによりグルタミン酸に変異し、TRAF6 の機能を阻害している。しかし、OspI により脱アミド化修飾された Ubc13 が TRAF6 の機能を阻害する、反応機構は不明であった。そのため、Ubc13 の脱アミド化修飾による炎症応答経路阻害機構の理解を目的とした。

(2) ユビキチンリガーゼ IpaH ファミリーの立体構造および基質認識機構解析

IpaH ファミリーは特定の基質タンパク質にユビキチンを付加するユビキチンリガーゼの機能を持つエフェクターである。IpaH ファミリーは赤痢菌、サルモネラ属、エルシニア属菌等多数の病原菌に共通して存在し、宿主の免疫反応等に関わるタンパク質をユビキチン化することで分解へと導き、防御反応を阻害している。また、赤痢菌では 10 種類の IpaH ファミリータンパク質が存在し、それぞれ特定の宿主タンパク質の分解に関与している。そこで、IpaH ファミリーによる宿主標的タンパク質認識機構を構造解析により、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) OspI による NFκB 炎症応答阻害機構の解析

OspI により修飾を受けた脱アミド化型 Ubc13 による感染機構解明のため、脱アミド化型 Ubc13 の構造解析を行う。また、脱アミド化型 Ubc13 を用い、TRAF6 の各反応過程を解析することにより、阻害機構の解析を行う。

(2) IpaH9.8 基質認識部位の構造解析

IpaH9.8 は宿主細胞の炎症性サイトカイン遺伝子の発現に必要な転写因子 NF-κB の活性化に関わる NF-kappa-B essential modulator (NEMO) をユビキチン化修飾し、分解へと導く。また、IpaH9.8 は NEMO 以外に guanylate binding protein-1 (GBP1) に対してユビキチンリガーゼ活性を持つことが新たに報告された。赤痢菌の感染において重要な役割を持つ IpaH9.8 の特異的な基質認識機構を、結晶構造解析法を用いて解析する。

(3) IpaH9.8 基質タンパク質の構造解析

IpaH9.8 による宿主標的タンパク質の認識機構解明を目的として、ユビキチン化修飾を受ける基質タンパク質 NEMO および GBP1 の IpaH9.8 結合部位の結晶構造解析を行う。

(4) IpaH1.4/2.5 基質認識部位の構造解析

IpaH1.4/2.5 は宿主の NF-κB の活性化に関わる LUBAC 複合体の HOIP サブユニットをユビキチン化修飾することにより分解へと導く。結晶構造解析により IpaH1.4/2.5 による LUBAC 認識機構を解析する。

(5) IpaH1880 の結晶構造解析

IpaH ファミリーのひとつ IpaH1880 は、他のメンバーと比較し、自己ユビキチン化活性が低く異なる特性を持つ。IpaH1880 の X 線結晶構造解析、X 線小角散乱により、IpaH ファミリーの活性調節機構の解析を行う。

(6) 新規ユビキチンリガーゼ反応機構の解析

エルシニア属細菌エフェクター YopM は、がん転移抑制遺伝子産物 BRMS1 において報告された新規 E3 活性モチーフ(CXD)を含む新規な E3 機能部位を持つ。YopM の構造解析により CXD モチーフによる E3 反応機構の解析を行う。

4. 研究成果

(1) OspI による NFκB 炎症応答阻害機構の解析

脱アミド化 Ubc13 の構造解析
Ubc13 は TRAF6 の活性化に必要なユビキチン結合酵素である。本酵素は OspI により脱アミド化修飾を受けることで、TRAF6 活性化の機能を失う。脱アミド化修飾による Ubc13 の不活性化機構解析のため、脱アミド化型 Ubc13 の結晶構造解析を行った。決定した脱アミド化型 Ubc13 と野生型構造との比較より、全体構造に大きな変化は見られないが、Gln100 の脱アミド化により、分子内部に水分子を介した新たな水素結合が形成されるこ

とが明らかとなった。

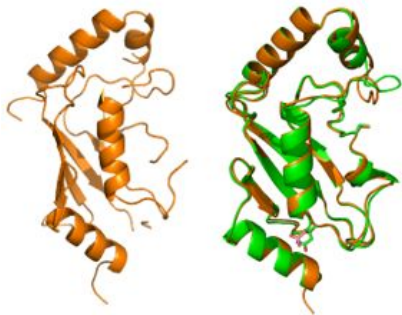


図 1. 脱アミド化型 Ubcl13(オレンジ)(左)と野生型 Ubcl13(緑)との構造比較(右)

脱アミド化 Ubcl13 によるユビキチン系阻害経路の解析

脱アミド化修飾により Ubcl13 の関わるとの反応経路が阻害されるかを解析するため、脱アミド化型酵素を用い、Ubcl13 への Ub 転移、Ub 鎖伸長、基質への Ub 化修飾反応を解析した。その結果、脱アミド化修飾は基質の Ub 化修飾の過程を阻害していることを明らかにした。

(2) IpaH9.8 基質認識部位の構造解析

IpaH ファミリーは N 末側にロイシンリッチリピート(LRR)から成る基質認識ドメイン、C 末側に Novel E3 ligase(NEL)ドメインからなるユビキチンリガーゼドメインを持つ病原性細菌に特有のユビキチンリガーゼである。IpaH9.8 はこれまでに NEL ドメインの立体構造が報告されたが、LRR ドメインの立体構造は未知である。IpaH9.8 LRR ドメインによる NEMO 認識機構の解明を目指し精製、結晶化、X 線結晶構造解析を行った。IpaH9.8 LRR は立体構造既知の IpaH3 LRR や IpaH ファミリーに属する、サルモネラ SspH1 LRR と類似の全体構造をとっていた。しかし、SspH1 において報告された基質認識領域の表面電荷はそれぞれの LRR で異なっており(図 2)、特徴的な電荷分布により IpaH9.8 LRR が NEMO を認識することが示唆された。

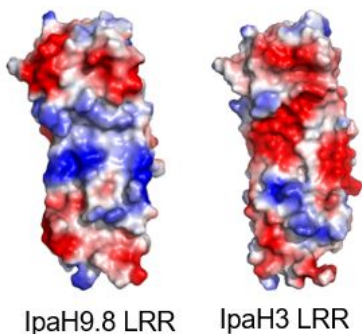


図 2. IpaH9.8(左)と IpaH3 (右) LRR ドメインの表面電荷分布(赤：酸性、青：塩基性)

(3) IpaH9.8 基質タンパク質の構造解析

IpaH9.8 による NEMO 認識機構の構造解析

IpaH9.8 は宿主の標的タンパク質として、NEMO を認識する。IpaH9.8 による NEMO 認識機構の理解を目指し、IpaH9.8 により認識される部位を含んだ NEMO (アミノ酸残基番号 259-364)の発現系を作製し、精製、結晶化、X 線結晶構造解析を行った。その結果、分解能 3.5Å で位相決定に成功したが、IpaH9.8 との相互作用に関係する部位は電子密度が不鮮明であり、構造決定できなかった。今後は IpaH9.8 との複合体状態の構造解析を行う必要がある。

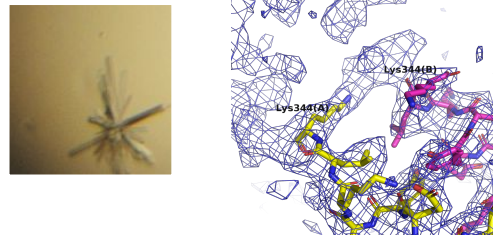


図 3. NEMO 259-364 の結晶(左)と NEMO の IpaH9.8 により認識される部位近辺の電子密度図(右)

IpaH9.8 による GBP1 認識機構の解析

IpaH9.8 は宿主の GBP タンパク質を基質としてユビキチン化することが、最近報告された。IpaH9.8 による GBP1 認識機構解明のため、GBP1 全長、C 末ドメイン、C 末端ヘリックスの発現系を作製し、これらの領域が IpaH9.8 と相互作用することを確認した。

(4) IpaH1.4/2.5 基質認識部位の構造解析

IpaH1.4/2.5 は LUBAC 複合体の HOIL-1L、HOIP サブユニットを認識し、HOIP に Ub を付加する。相互作用解析により IpaH1.4/2.5 の LUBAC 認識部位を決定し、IpaH1.4/2.5 基質認識部位の精製、結晶化を行い、結晶化に成功した。

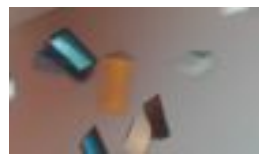


図 4. IpaH2.5 結晶

(5) IpaH1880 の結晶構造解析

IpaH1880 のユビキチン化反応機構の解析を目指し、IpaH1880 全長を大腸菌発現系より精製し結晶化を行った。作製した結晶は SPring-8 BL44XU ビームラインで X 線回折データを収集し、分解能 3.4Å で構造を決定した。しかし、決定した構造から、ユビキチン化機構の詳細を理解するには、分解能が不十分なため、さらに結晶化条件の検討を行う必要がある。また、IpaH ファミリーは溶液状態において、構造変化による機能調節が報告されていることから、X 線小角散乱により溶液状態の解析を行った。

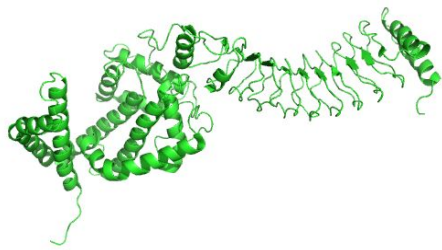


図5 IpaH1880の全体構造

(6) 新規ユビキチンリガーゼ反応機構の解析

YopMはN末側のCXDモチーフとLRRから構成されるエフェクタータンパク質である。YopMの構造は195/P株由来のタンパク質で報告されていたが、E3活性の有無は不明であった。そこで、CXDモチーフとLRRから成るE3の反応機構解析のため、活性が報告されたものと同じ91001株由来YopMを用い、結晶化、X線結晶構造解析を行った。その結果、91001株由来YopMは195/P株由来YopMと類似の構造をとり、共にE3活性を持つことが示唆された。また、YopMと同じCXDモチーフは赤痢菌IpaH4.5にも保存していることから、IpaH4.5と高い保存性を持つIpaH9.8 LRR (IpaH9.8ではCLI)と立体構造を比較した。その結果、CXDモチーフを含むYopMのN側の立体構造はIpaH9.8 LRRのN側構造とよく一致しており、IpaH4.5のCXDモチーフもE3活性を有する可能性を示した。

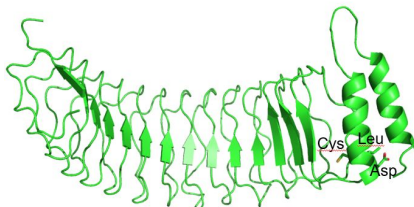


図6. *Yersinia pestis* 91001株 YopMの結晶構造(CLDモチーフをスティックモデルで表示)

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 2件)

Suzuki, S., Suzuki, T., Mimuro, H., Mizushima, T., Sasakawa, C., *Shigella* hijacks the glomulin-cIAPs-inflammasome axis as a unique mechanism to control inflammasomes. *EMBO rep.*, **19**, 2018, 89-101. 査読有
doi: 10.15252/embr.201643841

Takagi, K., Kim, M., Sasakawa, C., Mizushima, T., Crystal structure of the substrate recognition domain of *Shigella* IpaH9.8 E3 ligase. *Acta Cryst* **F72**, 2016, 269-275. 査読有
doi: 10.1107/S2053230X16002715

[学会発表](計 19件)

Mizushima, T., Structural Insight into the Molecular Mechanisms of Bacterial Effectors, 2nd

Joint International Symposium of NSRRC, Taiwan, IPR, Osaka University, Japan, Establishment of Structural Biology Network in Asia and Oceania, Dec. 6-7, 2017

水島恒裕、ユビキチン修飾経路の新しい制御メカニズムの解析、さきがけ「生体分子の形と機能」10年間の展開、2017年9月2日、

水島恒裕、ユビキチン-プロテアソーム経路による生命制御の分子メカニズム、徳島大学薬学部講演会、2017年3月1日

水島恒裕、バクテリアの感染戦略：エフェクターによる宿主防御経路の阻害機構、県立健康生活科学研究所・理学部合同研究発表会、2017年2月10日

水島恒裕、病原細菌エフェクターによる宿主防御経路阻害の分子メカニズム、神戸大学/兵庫県立大学間交流セミナー、2017年1月6日

西出旭, Kim Minsoo, 桑原直之, 加藤龍一, 笹川千尋, 水島恒裕, 構造学的手法を用いた赤痢菌エフェクター IpaH ファミリーの反応機構の解析、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日-12月2日

高木賢治, 西出旭, Kim Minsoo, 笹川千尋, 水島恒裕, 赤痢菌エフェクターOspIによるTRAF6阻害機構の構造生物学解析、新学術領域「ユビキチンネオバイオロジー」領域班会議、2016年11月16-18日

西出旭, Kim Minsoo, 水島恒裕, 赤痢菌エフェクター IpaH1880 反応機構の解析、新学術領域「ユビキチンネオバイオロジー」領域班会議、2016年11月16-18日

高木賢治, 大津彩織, Kim Minsoo, 水島恒裕, 赤痢菌エフェクターIpaH9.8によるNEMO認識機構の解析、第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7-9日

西出旭, Kim Minsoo, 高木賢治, 古田徹郎, 笹川千尋, 水島恒裕, 赤痢菌エフェクターOspI触媒機構の解明、第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7-9日

Nishide, A., Kim, M., Takagi, K., Sasakawa, C., Mizushima, T., Structural Analysis of Reaction Mechanism of *Shigella flexneri* effector OspI, The Annual Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo for the School Year of 2015, Mar. 14-15, 2016

Takagi, K., Kim, M., Sasakawa, C., Mizushima, T., Structure and substrate recognition mechanism of IpaH9.8 LRR., 3rd

International Picobiology Institute Symposium
Structural and biological studies on pathogenic
and therapeutic targets, Dec. 8-9, 2015

Otsu, S., Takagi, K., Kim, M., Mizushima, T.,
Structural analysis of the recognition mechanism
of NEMO by *shigella* effector IpaH9.8, 3rd
International Picobiology Institute Symposium
Structural and biological studies on pathogenic
and therapeutic targets, Dec. 8-9, 2015

Nishide, A., Kim, M., Takagi, K., Sasakawa,
C., Mizushima, T., Structural Analysis of
Reaction Mechanism of *Shigella flexneri* effector
OspI, 3rd International Picobiology Institute
Symposium Structural and biological studies on
pathogenic and therapeutic targets, Dec. 8-9,
2015

Takagi, K., Kim, M., Mizushima, T. Structure
and substrate recognition mechanism of IpaH9.8
LRR, 3rd International Picobiology Institute
Symposium Structural and biological studies on
pathogenic and therapeutic targets, Dec. 8-9,
2015

西出旭, 高木賢治, Kim Minsoo, 水島恒裕、
赤痢菌エフェクター-OspI 触媒機構の解明、日
本結晶学会年会、2015年10月17-18日

大津彩織, 高木賢治, Kim Minsoo, 水島恒裕、
赤痢菌エフェクタータンパク質 IpaH9.8 によ
る NEMO の認識機構の解析、日本結晶学会年
会、2015年10月17-18日

水島恒裕、赤痢菌エフェクター-OspI による
免疫阻害機構の解析、大阪大学蛋白質研究所
セミナー、2015年8月28日

高木賢治、Kim Minsoo、水島恒裕、赤痢菌
エフェクター-IpaH9.8 基質認識ドメインのX
線結晶構造解析、第15回日本蛋白質科学会
年会、2015年6月24-26日

〔図書〕(計 1件)

病原菌によるユビキチンシステムのかく
乱 水島恒裕、金玟秀 ユビキチンネオバイ
オロジー ニュースレター Volume 3
70-73. (2015), 総ページ数 81、70-73.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 恒裕 (MIZUSHIMA, Tsunehiro)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号：90362269

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

KIM MINSOO (KIM, Minsoo)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：50466835