

令和元年6月5日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05186

研究課題名（和文）腸管病原細菌感染現象の横断的解析

研究課題名（英文）Cross-sectional analysis of infectious strategies of enteric bacterial pathogens

研究代表者

芦田 浩（ASHIDA, HIROSHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10535115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腸管病原菌の横断的解析により、腸管病原菌に共通する感染戦略を明らかにした。赤痢菌のエフェクターAは宿主標的シグナル因子を分解することで上皮細胞感染時の細胞死（necroptosis）を阻害し、感染持続に寄与する。また、エフェクターAはその類似エフェクターが他の腸管病原菌にも保存されており、エフェクターAによるnecroptosis阻害は幅広い腸管病原菌に共通する感染戦略であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、感染様式の異なる複数の腸管病原菌を用い、その感染現象を横断的に比較解析し、共通する感染戦略を解明した。本研究により得られた知見は幅広い腸管病原細菌を標的とする創薬・ワクチン開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have identified bacterial strategy that counteracts host cell death. Shigella effector A targets host proteins for degradation to inhibit necroptosis of infected epithelial cells, and promote bacterial colonization. Furthermore, by comparing another enteric bacterial pathogens, we have revealed that inhibition of necroptosis by effector A homologs seems to be a universal infectious strategy for enteric bacterial pathogens.

研究分野：細菌学

キーワード：エフェクター 細胞死 腸管病原菌

## 1. 研究開始当初の背景

腸管病原細菌が腸管感染を成立させるためには、宿主により誘導される様々な生体防御反応と対峙する必要がある。生体は病原細菌の感染を早期に検知し、素早く免疫系をはじめとする生体防御機構を誘導することで感染の拡大を防いでいる。腸管病原細菌感染では多様なPAMPs、DAMPsの産生により炎症、細胞死等の自然免疫応答が誘導される。これに対し、腸管病原細菌の多くはIII型分泌装置と呼ばれる特殊なタンパク分泌装置を介して複数の病原因子(エフェクター)を宿主細胞に分泌する。エフェクターは宿主細胞機能を菌にとって有利なものへと修飾することで様々な生体防御機構を抑制し、感染を成立させる。しかしながら、PAMPs、DAMPsは多くが未同定であり、またそれらに抵抗するためのエフェクターも多くが機能未知であるため、感染現象の本質的な解明には至っていない。

## 2. 研究の目的

多くの腸管病原細菌はIII型分泌装置よりエフェクターを分泌し、その特異的かつ巧妙な働きにより宿主細胞機能を制御する。この結果、病原菌は感染に伴い誘導される様々な生体防御機構を回避・抑制し、感染を成立させる。興味深いことに、エフェクターは特定の病原菌にのみ存在するものから、類似構造・機能を有するものが複数の病原菌に保存されているものまで幅広く存在している。このエフェクターの多様性および特異性は、感染様式の異なる様々な腸管病原菌の感染において、普遍的あるいは特異的な感染現象が存在することを示唆している。

本研究では赤痢菌感染をモデルとして、未だ明らかにされていないPAMPs、DAMP 依存的に誘導される新たな生体防御反応に対抗する病原菌の感染戦略(炎症抑制、細胞死制御)を明らかにすることを目的とした。同時に感染様式の異なる他の腸管病原菌感染を横断的に解析し、その普遍的もしくは特異的な感染現象を解明することことで真の細菌病原性を理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では赤痢菌を腸管病原菌のモデルとして、赤痢菌による新たな感染戦略を解明するとともに、感染様式の異なる複数の腸管病原菌の感染を横断的に解析することで、病原細菌が有する普遍的もしくは特異的な感染現象を解明する。本研究計画として、(1)赤痢菌感染時の新たな感染現象の解明、(2)腸管病原細菌感染における横断的解析、を行った。

(1)赤痢菌が宿主の生体防御機構に対抗する生存戦略を有するかを明らかにするため、各種エフェクター遺伝子欠損赤痢菌株を用いてスクリーニングを行った。具体的には細胞死、炎症誘導に焦点を当て、各種赤痢菌エフェクター遺伝子欠損株および野生株を培養細胞に感染させ、その宿主応答を比較することでエフェクタータンパクの関与を確認した。

関与の確認されたエフェクターに関しては、当該エフェクター遺伝子を培養細胞へ導入し、レポーターアッセイ、DNA マイクロアレイ解析を用いることにより、各エフェクタータンパクの作用するシグナル伝達経路を特定した。さらに、病原細菌野生株および各エフェクター遺伝子欠損株を感染させた培養細胞において、各種シグナル伝達経路構成因子の発現や活性の比較により各エフェクタータンパクの作用点を特定した。

(2) (1)で解明された赤痢菌エフェクターによる感染戦略が腸管病原細菌に普遍的なものか赤痢菌特異的なものを明らかにするため、感染様式の異なる他の腸管病原菌感染を用いて横断的に解析した。

#### 4. 研究成果

生体防御機構の一つである細胞死誘導は感染により損傷を受けた細胞を病原細菌ごと取り除くことで感染拡大を阻止するため、生体防御機構として効果的である。赤痢菌は上皮細胞に侵入、増殖し、感染を拡大させるが、上皮細胞感染においては感染後期に至るまで細胞死は認められない。このことは赤痢菌が増殖の場を保持するための感染戦略として、上皮細胞での細胞死を抑制していることを示唆している。しかし、その機構は多くが未解明であり、機能未知のエフェクターによる細胞死抑制機構が存在する可能性が示唆される。

ヒト腸管上皮培養細胞に様々な赤痢菌エフェクター遺伝子欠損株を感染させ、細胞傷害測定により細胞死制御に関与するエフェクターを探索した。この結果、エフェクターA 遺伝子欠損株感染で赤痢菌感染時の細胞死が上昇することが示された。この結果は、エフェクターA が赤痢菌感染時の上皮細胞死を抑制していることを示唆している。

続いてエフェクターA による細胞死抑制機構解明のため、細胞死の分類を試みた。エフェクターA 遺伝子欠損株感染時に確認される細胞死を、DNA 断片化、Caspase 依存性、細胞膜破壊といった判定基準で分類したところ、necroptosis であることが示唆された。

赤痢菌感染時の necroptosis 誘導シグナル因子である RIP1、RIP3 を検出したところ、野生株感染時に RIP1、RIP3 タンパクが減少していることが認められた。この RIP1、RIP3 のタンパク量減少はエフェクターA 欠損株感染では認められない。また、エフェクターA は他の腸管病原菌である EPEC、EHEC にもホモログタンパクが保存されている。実際に、EPEC、EHEC の野生株、エフェクターA ホモログ遺伝子欠損株を感染させると、野生株感染時に RIP1、RIP3 タンパクが減少していたが、エフェクターA ホモログ欠損株感染では認められない。そこでエフェクターA による直接的な関与を確認するため、293T細胞にエフェクターA 遺伝子を transfection し、RIP1 タンパク量を検出した。この結果、エフェクターA 発現では、RIP1 タンパク量の減少および分解産物が認められたことから、エフェクターA 依存的なタンパク減少であることが示された。

このエフェクターA ホモログのアミノ酸配列相同性検索より、本エフェクターはプロテアーゼ活性を有することが明らかとなり、そのプロテアーゼ活性変異体発現株では RIP1、RIP3 の分解は生じず、また感染時の necroptosis 阻害も認められなかった。

以上の結果より、赤痢菌、EPEC、EHEC のエフェクターA ホモログは自身のプロテアーゼ活性により RIP1、RIP3 を分解し、necroptosis 誘導を阻害することで感染持続に寄与するといった感染戦略を明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1) Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu PS, Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, **Ashida H**, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing

cholangitis. *Nature Microbiology*. 4 :492-503 (2019). doi: 10.1038/s41564-018-0333-1. 査読有り

2) Otsubo R, Mimuro H, **Ashida H**, Hamazaki J, Murata S, Sasakawa C. *Shigella* effector IpaH4.5 targets 26S proteasome subunit RPN13 to dampen cytotoxic T lymphocyte activation. *Cellular Microbiology*. e12974 (2019). doi: 10.1111/cmi.12974. 査読有り

3) Okano T, **Ashida H**, Suzuki S, Shoji M, Nakayama K, Suzuki T. *Porphyromonas gingivalis* triggers NLRP3-mediated inflammasome activation of macrophages in a bacterial gingipains-independent manner. *European Journal of Immunology*. 48, 1965-1974 (2018). doi: 10.1002/eji.201847658. 査読有り

4) **Ashida H** & Sasakawa C. Bacterial E3 ligase effectors exploit host ubiquitin systems. *Curr Opin in Microbiol*. 35, 16-22, (2017) doi: 10.1016/j.mib.2016.11.001. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1) **Hiroshi Ashida**, Chihiro Sasakawa, Toshihiko Suzuki 「The interaction analysis between microbiota and bacterial pathogens」、第17回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2018年

2) **芦田 浩**、笹川 千尋、鈴木 敏彦 「腸管病原細菌感染戦略の横断的解析」、第 22 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2018 年

3) **Hiroshi Ashida**, Toshihiko Suzuki 「Analysis of novel *Shigella* effector mechanism that regulate host cell death」第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年

4) **芦田 浩**、鈴木 敏彦 「赤痢菌による新たな細胞死制御機構の解明」第 91 回日本細菌学会総会、2018 年

5) **芦田 浩**、鈴木 敏彦、笹川 千尋  
ワクチンおよび抗生物質代替創薬開発の基盤となる腸管病原細菌感染モデルの構築とその機能解析、2017 年度生命科学系合同年次大会 (ConBio 2017; Consortium of Biological Science 2017)、2017 年

6) **芦田 浩**、笹川 千尋、EHEC マウス腸管感染モデルの構築とその解析、第 20 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会 2016 年

[図書] (計 2 件)

1) **芦田 浩**、鈴木 敏彦、笹川 千尋 「赤痢菌による自然免疫抑制戦略の解明」、化学療法の領域、vol. 33, p1281-1288、2017.

- 2) 芦田 浩、鈴木 志穂、鈴木 敏彦 「病原細菌によるインフラマソーム制御戦略」、月刊「細胞」49 (14)、695-699、2017

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。