

令和元年5月22日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14700

研究課題名(和文)病原細菌ユビキチンリガーゼの構造的特徴と機能発現機構の解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of bacterial ubiquitin ligases

研究代表者

水島 恒裕 (Mizushima, Tsunehiro)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90362269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌はエフェクターと呼ばれる病原性タンパク質を宿主細胞に分泌し、宿主の防御応答を妨げることにより感染する。赤痢、サルモネラ、エルシニア属菌などのエフェクターの中にユビキチンリガーゼ(E3)機能を持ったタンパク質が複数種類存在することが報告された。病原細菌独自に存在するNEL型やCXD型E3の機能や反応機構解明を目指したX線結晶構造解析によりCXD型E3として報告されたYopMの構造を2.5Å分解能で決定した。また、NEL型E3 IpaH9.8の基質認識ドメイン構造を決定し、基質認識機構を考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管病原細菌による炎症性下痢は世界の5歳未満児死亡原因で肺炎に次いで多く、有効なワクチンのない病原菌の存在により発展途上国を中心に多数の死者を出している。また、腸管病原細菌の感染は近年の多剤耐性菌の出現により先進国においても問題となっており病原細菌の感染機構解明や治療法の開発は重要な研究課題である。本研究で決定したエルシニアYopMおよび赤痢IpaH9.8基質認識領域の立体構造は、病原細菌の感染機構の理解に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic bacteria such as Shigella, Salmonella and Yersinia deliver a variety of virulence factors, called effectors, into host cells. Some of effectors hijack host proteins and function as E3 ubiquitin ligases. The NEL domain and CXD motif are different from those of the eukaryotic HECT and RING-finger E3 ligases. To elucidate the molecular mechanisms of bacterial E3 ubiquitin ligase effectors, we performed the structural and functional analyses of YopM and IpaH family proteins. In this study, we solved the crystal structure of Yersinia YopM, which has CXD motif at 2.5Å resolution. Shigella effector IpaH9.8 contains leucine-rich repeats (LRRs) involved in substrate recognition and NEL domain. We determined the crystal structures of substrate recognition domain of IpaH9.8. These structures provide insights into the structural features of bacterial E3 ubiquitin ligases.

研究分野：構造生物学

キーワード：蛋白質 酵素反応 ユビキチンリガーゼ エフェクター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系は状況に応じた量的、質的なタンパク質の調節により生命現象を制御する重要な翻訳後修飾経路である。この翻訳後修飾経路において、特異的な基質認識の役割を担うユビキチンリガーゼ(E3)は、哺乳類で約 600 種類存在し、RING 型、HECT 型、U-box 型などに分類されている。

近年、複数の病原細菌において哺乳類には存在しない Novel E3 ubiquitin ligase (NEL) ドメインを持つ E3 が報告された。これら病原細菌の E3 は宿主のユビキチン経路を利用し、防御反応に関わるタンパク質にユビキチンを付加することでプロテアソームによる分解へと導き、感染可能な環境を形成する。研究開始当初までに、NEL ドメイン単独状態の結晶構造は報告されていたが、NEL ドメインを介した E3 反応機構や基質認識機構の多くは未解明であった。また、エルシニア属細菌エフェクターの YopM において NEL とは異なる構造モチーフが E3 活性を示すことが示唆されており、がん転移抑制遺伝子産物 BRMS1 において報告された新規 E3 モチーフ (CXD) が YopM に含まれることを見出した。そこで、病原細菌に独自に存在する E3 の機能発現機構に着目した。

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。NEL ドメインは赤痢、サルモネラ属、エルシニア属菌などに保存されており、NEL ドメインを持った病原細菌 E3 の反応機構の理解は病原細菌を標的とした治療薬の開発につながる研究である。

### 2. 研究の目的

#### (1) NEL 型ユビキチンリガーゼ反応機構の解析

NEL 型 E3 は赤痢に 10 種類ある IpaH ファミリーやサルモネラ SspH1、SspH2 等、複数のグラム陰性菌に存在する。NEL ドメインは宿主の持つユビキチン結合酵素(E2)を使用することにより E3 活性を獲得し、宿主の防御応答に関わるタンパク質にユビキチンを付加する。構造生物学的手法を用いた解析により、既知の E3 と異なる NEL 型 E3 の分子機構の解明を目的とした。

#### (2) 新規ユビキチンリガーゼモチーフの構造及び機能解析

がん転移抑制遺伝子産物 BRMS1 で報告された新規 E3 モチーフ (CXD) が病原細菌エフェクターに存在することが見出された。CXD モチーフによるユビキチン化機構の解明を目的として病原細菌 CXD モチーフ含有タンパク質の構造および機能解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) NEL 型ユビキチンリガーゼ反応機構の解析

##### IpaH1880 の結晶構造解析

赤痢菌 NEL 型 E3 ファミリーのひとつ IpaH1880 は他のファミリータンパク質と比較し、自己ユビキチン化活性が低く、ユビキチン鎖の形成において異なる特性を持つと考えられる。IpaH1880 全長を用いた X 線結晶構造解析や X 線小角散乱により解析し、NEL 型 E3 ファミリーの活性調節機構の解析を行う。

##### IpaH4.5 NEL ドメインの機能及び構造解析

NEL ドメインの E3 反応機構解明を目指し、赤痢菌 IpaH4.5 NEL ドメインの E2 に対する相互作用解析、結晶構造解析を行う。

##### IpaH9.8 基質認識部位の構造解析

赤痢菌 NEL 型 E3 ファミリーに属する IpaH9.8 は宿主の防御応答に関わるタンパク質である NEMO や GBP1 をユビキチン化修飾し分解へと導く。NEL 型 E3 の機能発現機構、基質認識機構の解明を目指し IpaH9.8 の NEMO および GBP1 認識部位である LRR ドメインの結晶構造解析を行う。

#### (2) 新規ユビキチンリガーゼモチーフの構造及び機能解析

##### エルシニア属細菌エフェクター YopM の構造解析

エルシニア属細菌エフェクター YopM は CXD モチーフを持ち、CXD モチーフが E3 活性に関与することが報告された。CXD モチーフにより発現する E3 機能の発現機構解明を目的として、YopM の結晶構造解析を行う。

##### 赤痢菌 CXD モチーフタンパク質の発現系作製

E3 活性を持つことが報告された YopM と高い相同性を持つ赤痢菌タンパク質 IpaH4.5 は CXD モチーフを有する。IpaH4.5 の発現系を作製し、YopM 以外のエフェクタータンパク質が CXD モチーフにより E3 機能を発現するかどうかを解析する。

##### ヒト CXD モチーフタンパク質の探索

LRR は 20-30 残基のアミノ酸の繰り返し配列から成るタンパク質の構造モチーフであり、LRR を持つタンパク質はヒトにも多数存在する。YopM で報告された CXD-LRR モチーフが病原細菌以外にも存在し、E3 機能を有するかどうかを解析するため、LRR を持つヒトタンパク質の中から LRR の N 末側に CXD モチーフを持つタンパク質を探索する。また、ヒト CXD-LRR タンパク質の発現系構築を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) NEL 型ユビキチンリガーゼ反応機構の解析

###### IpaH1880 の結晶構造解析

IpaH1880 のユビキチン化反応機構の解明を目指し、LRR ドメイン、NEL ドメインを含む IpaH1880 全長の大腸菌発現系を作製し、培養、精製、結晶化を行った。IpaH1880 結晶は SPring-8 BL44XU ビームラインで X 線回折実験を行い 3.4Å 分解能のデータを収集した。分子置換法により決定した IpaH1880 構造は全長構造既知なサルモネラ SspH2 とは異なり活性部位が分子表面に露出した open 型構造であった(図 1)。また、同じ open 型構造をとる赤痢菌 IpaH3 の全長構造との違いも見られ、これら立体構造の違いが IpaH1880 の機能特性に関与することが示唆された。しかし、IpaH1880 のユビキチン化機構の詳細を理解するためには、さらに結晶化条件の検討を行い高分解能で構造解析を行う必要がある。また、X 線結晶構造解析と共に溶液状態における NEL 型 E3 の構造を X 線小角散乱により解析し、IpaH1880 は溶液状態でも open 型構造をとることが示唆された。

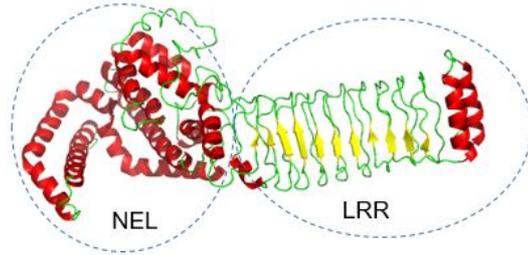


図 1 IpaH1880 の全体構造

###### IpaH4.5 NEL ドメインの機能及び構造解析

赤痢菌 NEL ファミリーは宿主の E2 酵素と複合体を形成し、E2 から自身の活性部位 Cys に Ub を受け取った後に標的タンパク質に Ub を転移する。NEL ドメインの E3 機能を活性化する E2 としてこれまでにヒト UbcH5 が報告されているが、UbcH5 と NEL ドメインの複合体構造は報告されていない。種々の E2 を用いたプルダウン解析により、NEL ドメインに強く結合する E2 の探索を行い、UbcH3 が他の E2 より強く結合しているという結果を得た(図 2)。そこで、UbcH3 と IpaH4.5 NEL を混合し結晶化を行ったが、得られた結晶は IpaH4.5 NEL 単独のものであった。

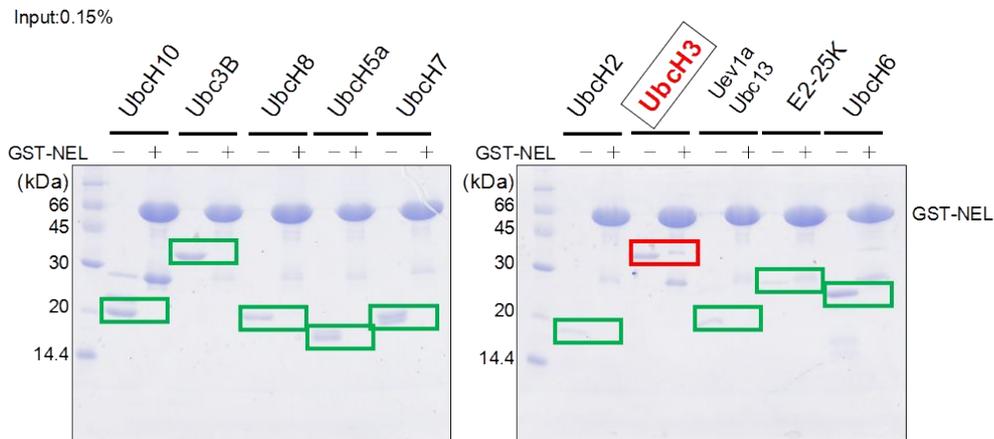


図 2 IpaH4.5 NEL と E2 酵素の相互作用解析

###### IpaH9.8 基質認識部位の構造解析

赤痢菌 IpaH ファミリーは N 末側に基質認識の役割を担うロイシンリッチリピート(LRR)ドメイン、C 末側に NEL ドメインを持つ NEL 型 E3 である。病原細菌感染に対する宿主の防御応答機構に関わるタンパク質 NEMO や GBP1 を標的とする IpaH9.8 の基質認識機構解明のため、IpaH9.8 基質認識部位である LRR の X 線結晶構造解析を行った。また、IpaH9.8 LRR と構造既知な IpaH ファミリーの LRR との構造比較から、IpaH9.8 は特徴的な電荷分布を持つことが明らかとなった(図 3)。LRR の特徴的な表面電荷が基質認識特異性に関与していると考えられる。

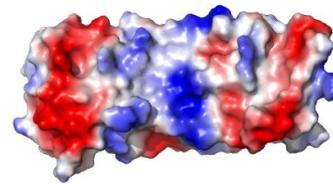


図 3 IpaH9.8 基質認識部位表面電荷分布(赤：酸性、青：塩基性)

##### (2) 新規ユビキチンリガーゼモチーフの構造及び機能解析

###### エルシニア属細菌エフェクター YopM の構造解析

YopM は N 末側の CXD モチーフと LRR から構成されるエルシニア属細菌エフェクターである。これまでに、195/P 株由来 YopM の構造が報告されているが E3 活性の有無は不明である。そこで、CXD モチーフと LRR による E3 活性の反応機構を解析するため、E3 機能の研究が行われている 91001 株由来 YopM を用い、結晶化、X 線結晶構造解析を行い、E3 活性を有する CXD モチーフの立体配置を決定した(図 4)。また、構造解析より 91001 株由来 YopM の全体構造が 195/P 株由来 YopM と非常によく似た構造であることを明らかにした。

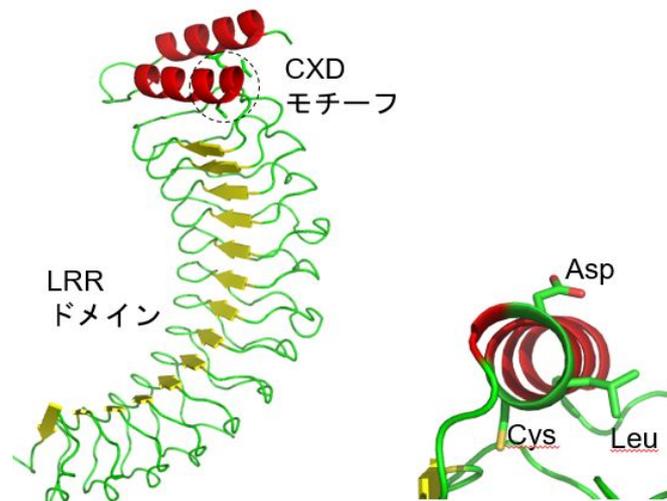


図4 91001株由来 YopM 全体構造(左)と CXD モチーフの構造(右)

#### 赤痢菌 CXD モチーフタンパク質の発現系作製

赤痢菌 IpaH4.5 は N 末の基質認識ドメインに YopM と同様の CXD モチーフと LRR ドメインを持つ。また、CXD モチーフは他の赤痢菌 IpaH ファミリーには存在しない。IpaH4.5 は C 末に E3 活性を持つ NEL ドメインを持つことから、CXD モチーフによる E3 活性の解析から NEL の影響を排除するため CXD-LRR 領域の発現系を作製した。しかし、IpaH4.5 CXD-LRR は精製のために融合したタグを切断することにより大部分が不溶性となった。IpaH4.5 CXD-LRR はタンパク質の安定性に問題が見られたことから、精製や安定化条件を検討し、E3 活性等機能解析を行うことが必要である。

#### ヒト CXD モチーフタンパク質の探索

YopM の持つ新規 E3 モチーフと共通の特徴を持つヒトタンパク質の探索を行い、免疫系タンパク質の一つでありインフラマソームの構成成分である NLRP3 中に CXD から LRR へとつながる領域が存在することを見出した。ヒト NLRP3 は 1036 アミノ酸残基からなり、複合体タンパク質の構成成分であることから、タンパク質全長を用いた機能解析は困難であると考え、CXD-LRR を含む領域である 711-1036 をクローニングし大腸菌発現系を構築した。NLRP3 711-1036 は MBP タグまたは SUMO1 タグとの融合タンパク質として大腸菌発現系を構築し、精製を行ったが機能解析に十分な収量のタンパク質を得ることができなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔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 12 件)

平木慶人、高木賢治、Kim Minsoo、水島恒裕、赤痢菌エフェクターによる免疫反応抑制機構の解明、技術・人材マッチング交流会、2019年2月12日

平木慶人、高木賢治、Kim Minsoo、水島恒裕、赤痢菌エフェクタータンパク質 IpaH1.4/2.5 による LUBAC 複合体認識機構の解析、第 65 回日本生化学会近畿支部例会、2018年5月26日

Mizushima, T., Structural Insight into the Molecular Mechanisms of Bacterial Effectors, 2<sup>nd</sup> 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

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。