

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790330
 研究課題名 (和文) 病原性大腸菌の粘膜上皮感染による細胞周期停止の作用機構の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of host cell cycle arrest mechanism by EPEC infection

研究代表者
 金 玫秀 (Kim Minsoo)
 東京大学・医科学研究所・特任助教
 研究者番号：50466835

研究成果の概要 (和文)：EPEC 感染による細胞周期の停止は EPEC から分泌されるエフェクター分子 Cif によるものであることを明らかにした。Cif は感染細胞内で標的分子と結合し、細胞周期を G1 期に停止させる。この結果から、EPEC は細胞周期を停止させることで腸管のターンオーバーを抑制し、上皮細胞へ効率よく定着すると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：EPEC infection causes host cell cycle arrest. We found that Cif (cell cycle inhibiting factors) secreted by EPEC on bacterial infection inhibited host cell cycle progression at G1 Phase by interacting with host cell factor. Our study suggested that EPEC deploys a special tactic to prevent rapid epithelial turnover in order to maintain epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：感染免疫、細胞周期、病原性大腸菌

1. 研究開始当初の背景
 腸管病原性大腸菌は乳幼児を中心に下痢が

発症する病原性大腸菌で、感染の過程で菌が有するタイプ III 分泌装置を介して一群の病

原因子(エフェクター)を宿主細胞に移動させることが知られている。近年、病原細菌の感染において細胞周期を制御するエフェクターが報告され、これらの病原細菌のエフェクターや毒素を「サイクロモジュリン」と呼ぶことが提唱された。病原細菌は感染の過程で様々な宿主因子と相互作用し、感染を成立させることが最近の研究で明らかになってきた。しかし、細菌エフェクター分子には未解析のものが多く、本研究ではこれらの細菌エフェクター分子の機能を明らかにすることで、感染成立機構の解明に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究計画では、病原性大腸菌の感染成立に至る過程を、特に各感染過程における宿主細胞の細胞周期制御に関わるエフェクターの機能を明らかにし、感染に果たす役割を解明することを目指す。具体的には腸管病原性大腸菌 (EPEC) のエフェクターである “Cif” の解析を行う。野生株を細胞に感染させると細胞周期が停止するが、Cif の欠損株を感染させると細胞周期停止能がなくなることからサイクロモジュリンとして働いているとされている。しかし、Cif による細胞周期の停止メカニズムや作用機構などはほとんど知られていない。Cif の細胞内機能および感染に果たす役割について宿主結合分子を同定し、Cif による細胞周期停止の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) EPEC のエフェクター Cif が感染成立に果たす役割を解析する。野生型と上記エフェクター欠損株を感染対象となりうる上皮細胞・マクロファージ細胞・リンパ球系細胞株に感染させ、侵入効率・細胞死誘導能力・細胞接着・細胞周期などを

指標にエフェクターの役割を調べる。

- (2) エフェクターに対する抗体、及び GFP との融合蛋白質発現系を作製し、各エフェクターの宿主細胞内局在を蛍光顕微鏡や免疫電顕等で明らかにする。
- (3) 特に上記のエフェクターは細胞周期の進行に関わっていると予想されるため、細胞周期依存的に局在の変化を調べることは重要な情報である。最近開発された、生細胞の細胞周期の進行をリアルタイムで観察できる蛍光プローブ Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) を用いて、細胞周期を可視化できる。Fucci を安定的に発現する細胞株を用いて、EPEC 野生株及び Cif 変異体株を感染させ、蛍光顕微鏡で live-imaging を観察し、詳しくどの細胞周期に異常があるかを観察する。
- (4) Cif の様々な部分欠失変異体や点変異体を作製し、(1)や(2)の結果から得られたエフェクターの表現型(局在の変化、細胞周期への影響など)を指標として、エフェクターの機能ドメインを決定する。これらの結果から機能ドメインと予想されたアミノ酸を変換した EPEC の変異株作成し感染対象となりうる細胞に感染させ、細胞周期への影響などを調べる。EPEC 感染に果たす Cif の機能を明らかにする。
- (5) Yeast-Two-hybrid 法により Cif の宿主標的蛋白質を同定する。いくつか同定した標的宿主蛋白質と Cif との結合を *in vitro* pull-down assay 及び免疫沈降を用いて宿主細胞で結合していることを確認する。Cif と同定した標的蛋白質の結合が細胞周期にどのように影響するかを調べる。

4. 研究成果

- (1) EPEC のエフェクター Cif が感染成立に果たす役割を解析するため、野生型と上記エフェクター欠損株を上皮細胞に感染させ、細胞死誘導能力・細胞接着・細胞周期などを調べた。その結果、野生株感染では細胞周期の進行に以上があることが明らかになった。細胞周期進行は、ユビキチン化を介した細胞周期調節因子群の選択的分解が中心的な役割を果たしている。そこで申請者は、Cif による細胞周期抑制と蛋白質分解の関連について検討した。EPEC 感染細胞内でのユビキチン化された蛋白質を調べた結果、野生株の感染 (WT) では、非感染 (ni) や *cif* 欠損株感染 (Δcif) に比べてユビキチン化蛋白質が蓄積していることを見出した (図 1)。Cif は宿主のユビキチン経路への干渉を通して、細胞周期を抑制していることが予測された。
- (2) GFP との融合蛋白質発現系を作製し、エフェクターの宿主細胞内局在を蛍光顕微鏡で調べた。その結果、GFP-Cif は核に局在することを観察した。細胞周期進行に関わる蛋白質の多くは核に局在するため、上記のエフェクターが細胞周期の進行に関わっていると予想される重要な情報である。
- (3) 野生株及び Cif 変異体株を感染させ、蛍光顕微鏡で live-imaging を観察し、詳しくどの細胞周期に異常があるかを観察した。SCF 複合体の基質 (赤) と APC の基質 (緑) のそれぞれに異なる蛍光蛋白質を融合し発現させた Fucci 細胞に、EPEC を感染させると、*cif* 欠損株感染 (Δcif) と比較して

野生株感染 (WT) では細胞周期が G1 期で停止していた (図 1)。

- (4) Cif の様々な部分欠失変異体や点変異体を作製し、(1)や(2)の結果から得られたエフェクターの表現型(局在の変化、細胞周期への影響など)を指標として、エフェクターの機能ドメインを決定し、システイン 109 が活性に大事であることを見いだした。これらの結果からシステイン 109 をアルギニンに置換した EPEC の変異株を作成した。変異株を HeLa 細胞に感染させ、細胞周期への影響などを調べた結果、細胞周期停止能がないことを見いだした。以上の結果から Cif のシステイン 109 は細胞周期制御能に重要であることを示唆された。
- (5) Yeast-Two-hybrid 法や Protein micro array 法により Cif の宿主標的蛋白質の同定を試みた。その結果、いくつか標的宿主蛋白質を同定した。同定した標的宿主蛋白質に対して Cif との結合を *in vitro* pull-down assay 及び免疫沈降を用いて宿主細胞内で結合していることを確認した。同定した標的宿主蛋白質の抗体を作成し、細胞内の局在を調べ

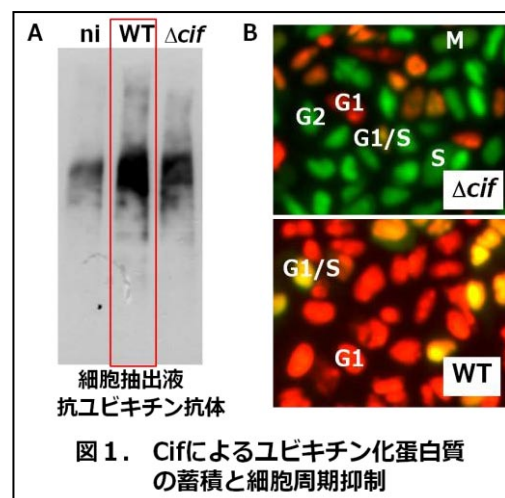


図 1. Cifによるユビキチン化蛋白質の蓄積と細胞周期抑制

た結果、GFP-Cif と同様に核内に局在することを見いだした。これらの結果から、Cif の標的宿主蛋白質と結合して細胞周期をG1期に停止させると考えられる。

EPEC は、有効なワクチンもいまだに開発されていないため、新たな治療薬の開発が望まれている。本研究によって明らかになる Cif と標的因子との分子基盤を、抗菌剤や蛋白質機能を制御する手法開発につなげることが期待できる。Cif ホモログは EPEC のみならず、0157 や *Burkholderia* 属菌等の病原細菌にも存在することから、広範な腸管病原細菌の治療薬の開発に貢献できると考えられる。

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 3 件)

1. Kim M, Nakamoto T, Nishimori S, Tanaka K, Chiba T, A new ubiquitin ligase involved in p57^{KIP2} proteolysis regulates osteoblast cell differentiation, *EMBO reports*, 査読有, 9, 878-884 (2008)
2. Kim M, Ogawa M, Fujita Y, Yoshikawa Y, Nagai T, Koyama T, Nagai S, Lange A, Fassler R, Sasakawa C, Bacterial hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment, *Nature*, 査読有, 459, 578-582 (2009)
3. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim Minsoo, Mimuro H, Nakagawa I, Yanagawa T, Ishii T, Kakizuka A, Sztul E, Chakraborty T, Sasakawa C, *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition, *Nature Cell biology*, 査

読有, 11 (19), 1233-1240 (2009)

[学会発表] (計 2 件)

1. 金 玫秀、赤痢菌のエフェクターによる腸管上皮細胞のターンオーバー抑制、日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸ポートアイランド
2. 金 玫秀、細菌エフェクターOspEとインテグリンリンクドキナーゼの結合による感染細胞の剥離抑制機構、日本分子生物学会、2009年12月9日、横浜

[図書] (計 1 件)

1. Tezuka T, Kim M, Yamamoto T, NOVA publishers, Cbl proteins, 2008, 195-199

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/post_16.php
http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/post_18.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 玫秀 (Kim Minsoo)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50466835

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：