

機関番号 : 12601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790414

研究課題名 (和文) 赤痢菌エフェクタータンパクによる宿主免疫応答抑制機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of *Shigella* type III effector mediated downregulation mechanism of host inflammatory response.

研究代表者

芦田 浩 (ASHIDA HIROSHI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 : 10535115

研究成果の概要 (和文) :

赤痢菌より宿主細胞内に分泌された IpaH9.8 は、炎症反応の中心的な役割を担う転写因子 NF- κ B の活性化に必須な IKK γ /NEMO タンパクを標的として攻撃する。IpaH9.8 は、自身の有する E3 ユビキチンリガーゼ活性により NEMO をユビキチン化し、プロテアソーム分解へと導く。この結果、NF- κ B の活性化が抑制され、赤痢菌感染に対抗するための免疫応答が抑制され、菌は腸管上皮内で感染を持続・拡大する。

研究成果の概要 (英文) :

IpaH9.8, a *Shigella* effector possessing E3 ubiquitin ligase activity, dampens the NF- κ B-mediated inflammatory response to the bacterial infection. IpaH9.8 targets NEMO/IKK γ for polyubiquitination, and consequently, the polyubiquitinated-NEMO underwent proteasome-dependent degradation and perturbed the NF- κ B activation. Since NEMO is essential for NF- κ B activation, the polyubiquitination and degradation of NEMO during *Shigella* infection is a novel bacterial strategy to modulate host inflammatory responses and promote bacterial infection.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010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: 細菌学 (含真菌学)

科研費の分科・細目: 基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード: 赤痢菌、エフェクター、ユビキチン、炎症

1. 研究開始当初の背景

我々の体は、病原細菌の侵入を感染初期に

感知し、免疫系を素早く誘導することで感染を防いでいる。感染初期に病原細菌の侵入を

感知し、増殖を阻止する自然免疫系とそれに続き誘導される獲得免疫を発動することは、菌の感染を効果的に阻止するために不可欠な機能である。これに対し、赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌は、感染を持続・拡大するために、III型分泌装置と呼ばれる特殊なタンパク分泌装置より病原因子（エフェクター）を宿主細胞内へ分泌することで、炎症をはじめとする生体防御反応を抑制して自然免疫を克服し感染を成立させる。このエフェクターによる免疫応答抑制機構は赤痢菌のみならず、サルモネラやエルシニア、O157といった多くの病原細菌でも認められる事実は、病原細菌の感染において免疫応答抑制という新たな戦略が、感染持続のためにいかに重要であるかを示唆している。しかしながら、免疫抑制を担うエフェクターの機能解析は未だ十分になされておらず、多くが未解明なままである。

2. 研究の目的

赤痢菌のエフェクターの一つである IpaH ファミリータンパクは、N末端近傍のロイシンリッチリピート領域と保存性の高いC末端領域より構成され、そのC末端領域中にはE3 ユビキチンリガーゼ活性を有する。IpaH ファミリータンパクは赤痢菌の病原性プラスミドおよび染色体上に10コピーが存在し、相互に高い相同性を有している。赤痢菌のマウス肺炎惹起能を用いた感染実験の結果、*ipaH* 遺伝子欠損株感染マウスは野生株感染マウスに比べ、感染部位における好中球浸潤量、サイトカイン産生能の増加が認められ、炎症が増悪していることが明らかとなった。さらに感染マウス肺中の定着菌数を測定したところ、野生株に比べ、*ipaH* 欠損株投与マウスにおける定着菌数の著しい減少が認められた。以上の結果は、赤痢菌の分泌するIpaH ファミリータンパクの働きにより、菌の感染に伴う免疫応答は、菌が宿主生体内で生存しうる程度にまで抑制し、この間に菌は増殖、感染を持続していることを示唆している。当該遺伝子欠損株感染における炎症反応の増悪、定着菌数の著しい低下はこの生存戦略を裏付ける結果であると言える。このようにIpaH ファミリータンパクによる免疫応答抑制能は赤痢菌の感染持続において不可欠なものであるが、その詳細な抑制機構は明らかとなっていない。そこで本研究では赤痢菌IpaH ファミリータンパクによる宿主免疫応答抑制機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

赤痢菌 IpaH ファミリータンパクによる免疫抑制機構の解析において、本研究では、

- (1)IpaH タンパクの宿主標的因子の検索、
- (2)IpaH-宿主標的因子間の機能解析、(3)動物

感染実験による IpaH 免疫抑制能の確認、の3点を遂行した。

- (1) IpaH ファミリータンパクの一つである IpaH9.8 の宿主標的因子を酵母ツーハイブリッド法により探索した結果、NF- κ B 活性化に必須な I κ B キナーゼ複合体中の構成因子である IKK γ /NEMO (以降 NEMO と略) を同定した。両者の結合はブルダウンアッセイ、および免疫沈降においても確認された。
- (2) IpaH ファミリータンパクは E3 ユビキチンリガーゼ活性を有していることから、*in vitro* ユビキチネーションアッセイにより NEMO が IpaH9.8 E3 リガーゼの基質となるかを確認したところ、NEMO は IpaH9.8 によりユビキチン化修飾されることが示された。
- (3) IpaH9.8 による宿主炎症抑制能をマウス肺炎惹起能を用いた感染実験により評価したところ、IpaH9.8 は自身の E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的に炎症反応を抑制し、定着菌数を増加させていることを確認した。

4. 研究成果

侵入性細菌である赤痢菌は感染に伴い、激しい炎症を引き起こす。上皮細胞へと侵入した赤痢菌は、細胞質中で分裂・増殖する過程において菌体構成成分であるペプチドグリカン(PGN)を遊離する。菌から遊離された PGN は病原体認識センサーである Nod1 により認識され、NF- κ B の活性化を介し、炎症が引き起こされる。赤痢菌感染における炎症応答では NF- κ B が中心的な役割を果たしていることから、IpaH9.8 の NF- κ B 経路への関与を検討したところ、IpaH9.8 は自身の E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的に NF- κ B 活性を抑制していることが示された。そこで IpaH9.8 の NF- κ B 抑制機構を解明するため、宿主標的因子を酵母ツーハイブリッド法により探索したところ、I κ B キナーゼ複合体中の必須構成因子である IKK γ /NEMO が同定された。

IpaH9.8 は自身の E3 ユビキチンリガーゼ活性により NF- κ B 活性を抑制することから、IpaH9.8 は標的タンパクをユビキチン化修飾することによりその機能を制御していることが推測される。そこで、IpaH9.8 の結合タンパクとして同定された NEMO が IpaH9.8 E3 リガーゼ活性の標的となるかを *in vitro* ユビキチネーションアッセイにより検討した。この結果、IpaH9.8 野生型存在下では NEMO のポリユビキチン化が確認されたが、E3 ユビキチンリガーゼ変異体である IpaH9.8-CA 存在下では NEMO のユビキチン化修飾は認

められなかった。以上より、IpaH9.8 タンパクは、NEMO と結合後、自身の E3 ユビキチンリガーゼ活性により NEMO をユビキチン化修飾することが示された。ユビキチン化標識されたタンパクは、そのユビキチンの結合様式により、タンパク分解、シグナル伝達など、その機能が様々に制御される。そこで赤痢菌感染時における NEMO のタンパク安定性を検討したところ、IpaH9.8 の E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的に NEMO タンパクは分解が促進されることが確認された。さらに阻害剤を用いた解析の結果、IpaH9.8 によりユビキチン標識された NEMO は、宿主細胞のプロテアソーム分解装置により分解されることが示された。

IpaH9.8 は自身の E3 ユビキチンリガーゼ活性により、NEMO を標的とし、ユビキチン化、プロテアソーム分解へと導く。IpaH9.8 による NEMO 分解促進の結果、炎症性サイトカイン産生に必要な NF- κ B 活性化が抑制され、赤痢菌感染に阻止するための免疫応答が失われる。菌はこの間に細胞内増殖と細胞間拡散を継続することで感染を持続・拡大する。赤痢菌によるこの免疫抑制作用は、マウス肺炎惹起能による動物感染実験においても確認された。赤痢菌感染マウスにおいて、IpaH9.8 の E3 ユビキチンリガーゼ活性により、赤痢菌感染に伴う NF- κ B 依存的な免疫応答が抑制、感染部位への好中球浸潤の減少が認められ、この結果、定着菌数の著しい増加が認められた。一方、IpaH9.8 の E3 ユビキチンリガーゼ活性変異体を発現する赤痢菌感染においては、NEMO のユビキチン化とタンパク分解は認められず、NF- κ B 活性化に伴うサイトカイン産生の亢進、感染部位への好中球の浸潤により、炎症が増悪しており、菌は速やかに排除されていた。

上述のように、腸管粘膜上皮に対する侵略者である病原細菌は宿主による攻撃から自身の身を守る手段として、免疫応答抑制という高度な生存戦略により対抗し、感染を成立させている。IpaH9.8 タンパクと類似したタンパクは、赤痢菌以外にサルモネラを初めとするヒト、動物、魚、植物等の病原細菌も保有していることから、本病原因子を標的とする創薬は、未だ有効で安全なワクチンが存在しない赤痢菌を始め、上述の病原細菌に対する新たな治療法となる可能性がある。また、IpaH9.8 による NEMO への作用を通じて新たな免疫抑制剤の開発につながることを考えられる。

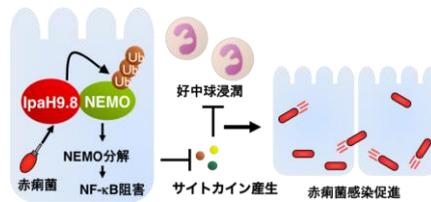


図. 赤痢菌 IpaH9.8 による宿主炎症抑制機構

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 4 件)

1. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Suzuki S, Sanada T, Punginelli C, Mimuro H, & Sasakawa C. *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. *Curr Opin in Microbiol.* 14, 16-23 (2011).
2. Ashida H, Kim M, Schmidt-Suppran M, Ma A, Ogawa M, & Sasakawa C. A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 effector targets NEMO/IKK γ to dampen the host NF- κ B-mediated inflammatory response. *Nat. Cell. Biol.* 12, 66-73 (2010).
3. Kim M, Ashida H, Ogawa M, Mimuro H, Yoshikawa Y, & Sasakawa C. Bacterial interactions with the host epithelium: bacterial countermeasures that disrupt intrinsic epithelial barrier function. *Cell Host & Microbe.* 8, 20-35 (2010).
4. Ashida H, Ogawa M, Mimuro H, & Sasakawa C. *Shigella* infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 337, 231-55 (2009).

[学会発表] (計 1 件)

Hiroshi Ashida and Chihiro Sasakawa. A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKK γ to dampen the host NF- κ B-mediated inflammatory response.

第 10 回 日韓国際微生物学シンポジウム, 2010 年 3 月 26 日, パシフィコ横浜

[図書] (計 3 件)

1. 芦田浩, 笹川千尋
感染・炎症・免疫 (2010) vol. 40,
No. 3 p. 67-70.

2. 芦田浩、笹川千尋
実験医学 (2010) vol.28, No.8
p.1281-1284

3. 芦田浩、笹川千尋
実験医学増刊 感染症-ウイルス・細菌・寄生虫の感染戦略 (2009)
p.199-204

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦田 浩 (ASHIDA HIROSHI)
東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 : 10535115