

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890154

研究課題名（和文） 宿主細胞内での病原細菌に対するユビキチン化メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of ubiquitination pathway to intracytoplasmic bacteria

研究代表者

吉川 悠子 (YOSHIKAWA YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：00580523

研究成果の概要（和文）：リステリア *actA* 変異株のオートファジー認識の起点となるユビキチン化メカニズムを解明するため、ユビキチン化される菌側の因子および宿主側のユビキチン修飾系因子の同定を試みた。その結果、宿主側因子について4種、菌側因子については2種の候補が得られた。菌側因子のリコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* ユビキチネーションアッセイを行ったところ、このうち1種類の菌体側分子が直接ユビキチン化を受けることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Ubiquitinated ActA-deficient *Listeria monocytogenes* ($\Delta actA$) were recognized by autophagy. To elucidate the mechanism of *Listeria* ubiquitination, we attempted to explore the bacterial ubiquitinated molecules and the host ubiquitination factors. As a result, two candidates of bacterial ubiquitinated molecules and four candidates involved in host ubiquitination system were identified by LC-MS/MS analysis. The recombinant proteins of *Listeria* candidate molecules were examined by *in vitro* ubiquitination assay, and one of the two candidates in *Listeria* was received ubiquitination directly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：細菌、感染症、リステリア、オートファジー、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

リステリアは汚染された食品や水を媒介として感染し、リステリア症を起こす。リステリア症は、健康な成人では無症状のまま経

過することが多いが、高齢者や免疫機能の低下した患者では、化膿性髄膜炎および敗血症などにより高い致命率を示す。特に妊婦では、胎児に垂直感染が起り、流産や死産の原因

となる。経口的に腸管に達したリステリアは非貪食性細胞にも貪食を誘起して侵入し、菌体外に分泌した LLO によりファゴソーム膜を溶解して細胞質へ脱出する。その後、リステリアは、菌体表面の ActA タンパク質により Arp2/3 複合体および VASP などの宿主タンパク質を菌体周囲に集積させる。そして、菌の一極にアクチン重合を促進することで得られた推進力を利用して、リステリアは細胞内を運動し、隣接細胞へと感染を拡大する。

オートファジーは *de novo* で生成されたオートファゴソーム膜が細胞質成分や細胞内に侵入した細菌を隔離し、これがリソソームと融合することにより内容物を分解する経路である。これまで、リステリアは細胞内運動によりオートファジーから「逃げて」いるものと考えられていた。しかし、研究代表者らはリステリアが ActA により宿主タンパク質の菌体表面への集積させることでオートファジーを回避し、この回避は菌の細胞内運動には依存しないことを明らかにした。

一方、宿主タンパク質を集積できない *actA* 変異株においては、菌体表面が直接ユビキチン化され、次にオートファジー依存的に分解される p62/SQSTM1 (p62) タンパク質がポリユビキチン鎖とオートファジーのマーカータンパク質である LC3 の間を繋ぎ、*actA* 変異株が選択的にオートファジーの基質として認識・分解されることを明らかにした(図 1)。

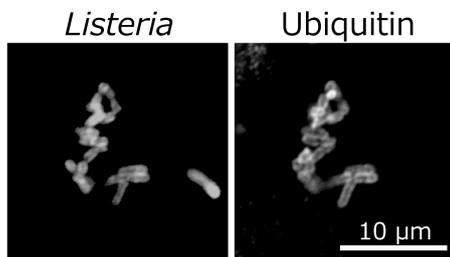


図 1. ユビキチン化されたリステリア *actA* 変異株

細胞質へと侵入した *Salmonella Typhimurium* の場合も、菌体がユビキチン化を受け、宿主タンパク質を集積できないリステリア *actA* 変異株と同様の機序で、オートファジーにより捕捉されることが報告されている。さらに、リステリアや赤痢菌と同様にアクチン重合により細胞内で運動性を示し、主に魚類および両生類に、時にヒトにも非定形抗酸菌症を起こす *Mycobacterium marinum* の場合は、マクロファージ内で菌体がユビキチン化され、リソソーム様の小胞内に隔離されるが、その前に菌はユビキチン化された細胞壁を脱落させることで隔離から逃れることが報告されている。

2. 研究の目的

細胞内分解系のユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーは、細胞の恒常性の維持に協調的に機能していることが知られている。p62 を介したリステリアや *S. Typhimurium* に対する宿主のオートファジー認識は、プロテアソームで分解不可能な神経変性疾患の原因となる、ユビキチン化変性タンパク質凝集体に対するオートファジー認識と同様の機構である。しかし、グラム陽性菌のリステリア、グラム陰性菌の *S. Typhimurium* およびミコール酸からなる脂質層を持つ抗酸菌の *M. marinum* は、それぞれ菌体の表層構造がかなり異なる。そのため、菌体表面のいずれの分子がユビキチン化されるかについて解明することは、様々な細胞内寄生菌に対する宿主の自然免疫による感染防御を考える上で極めて重要である。しかしながら、その機序は未だ明らかでない。そこで本研究では、ユビキチン修飾系の宿主細胞の自然免疫システムにおける役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) リステリア *actA* 変異株のユビキチン化は感染 MDCK 細胞内で高頻度に観察される。リステリア *actA* 変異株の菌体表面を効率よくユビキチン化させるため、MDCK 細胞溶解液やウサギ網状赤血球溶解液を用いた *in vitro* ユビキチネーションアッセイ (図 2)、または培養細胞や初代培養肝細胞へ *actA* 変異株を感染させた。
- (2) ユビキチン化された *actA* 変異株を回収し、界面活性剤処理により菌体表面の分子を菌体から遊離させた。
- (3) ユビキチン化された分子を含む可溶性画分を遠心分離により得た後、LC-MS/MS 法に供する。菌体表面のユビキチン化された菌側の因子およびユビキチン化された菌側因子と結合している宿主側のユビキチン化反応系因子を網羅的に解析した。
- (4) (3)にて得られた菌側因子について、過剰発現株や遺伝子欠損株を作製する。また、宿主側因子については発現をプラスミド

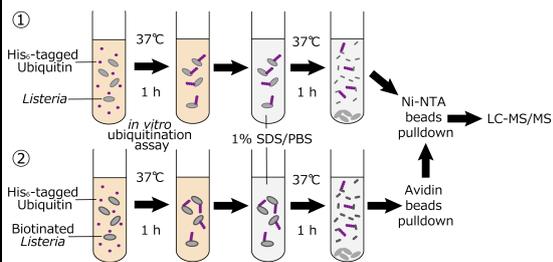


図 2. *in vitro* ubiquitination assay による LC-MS/MS 解析用サンプルの調整方法

ベクターなどによる遺伝子導入や RNAi 法により増減させた細胞を作製した。

4. 研究成果

まず、リステリア *actA* 変異株の菌体表面をユビキチン化させるため、*in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。MDCK細胞溶解液を用いるよりも、ウサギ網状赤血球溶解液を用いた方が、より効率よく *actA* 変異株ユビキチン化が起こることがわかった。

ユビキチン化された菌体を界面活性剤処理し、ユビキチン化された菌側分子を含む可溶性画分を LC-MS/MS 法に供して、菌体表面のユビキチン化された菌側の因子およびユビキチン化された菌側因子と結合している宿主側のユビキチン化反応系因子の同定を試みた。その結果、菌側因子については2種の候補が得られた。宿主側因子について、これまでにユビキチン修飾系に直接関与するとの報告がある分子が14種、その他に16種の宿主側分子が得られた。

このうち、2種類のユビキチン化を受けるリステリア菌体側の候補分子および既にユビキチンリガーゼ (E3) であると判明している4種類の宿主側の候補分子に注目し、*actA* 変異株のユビキチン化の解析を行った。

まず、宿主側の4種類の E3 分子について、RNAi 法にてそれぞれ発現をノックダウンさせた MDCK 細胞にリステリア *actA* 変異株を感染させ、ユビキチン化される菌体の割合を測定したが、コントロールと比べ、有意な差はなかった。また、それぞれの哺乳類細胞強制発現ベクターを作製し、恒常的に発現させた MDCK 細胞を作成したが、こちらも有意な差はなかった。

現在、これらの候補分子の HA や Myc などのタグを付加した強制発現ベクターを作製している。

また、菌体表面で起こるユビキチン化が菌側分子を基質としたものではなく、菌側分子と強く結合する宿主側因子がユビキチン化されている可能性もあることから、対象を E3 などのユビキチン修飾系の分子に限定せず、RNAi 法も含めて検証し、リステリアのユビキチン化に対する機能の検討を行う予定である。

次に、リステリア菌体側の2種類の候補分子の哺乳類細胞強制発現ベクターを作製したが、MDCK 細胞内での発現はいずれも観察されなかった。そこで、HA タグを付加したリコンビナントタンパク質を作製し、ウサギ網状赤血球溶解液を用いた *in vitro* ユビキチン化アッセイをそれぞれ行ったところ、このうち1種類の菌側分子が直接ユビキチン化を受けることが分かった。

現在、この候補分子の感染時における機能

を明らかにするため、GFP との融合タンパク質や Myc などのタグを付加した発現ベクターを構築し、培養細胞に導入して細胞内での局在などの表現型およびユビキチンとの共局在の観察を行っている。

また、遺伝子欠損株や *actA* との二重欠損株およびプラスミドによる過剰発現株を作製し、菌の形態や増殖の速度などに対する影響を解析する予定である。

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7件)

- ① Gaowa, W, W, W, Wu D., Yoshikawa Y., Ohashi N., Kawamori F., Sugiyama K., Ohtake M., Ohashi M., Yamamoto S., Kitano T., Takada N. and Kawabata H., Detection and Characterization of *p44/msp2* Transcript Variants of *Anaplasma phagocytophilum* from Naturally Infected Ticks and Wild Deer in Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 査読有、65、2012、P.79-83
- ② Ogawa M., Mimuro H., Yoshikawa Y., Ashida H. and Sasakawa C., Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit. Microbiology and Immunology, 査読有、55、2011、P.459-471
- ③ Ogawa M., Yoshikawa Y., Kobayashi T., Mimuro H., Fukumatsu M., Kiga K., Piao Z., Yoshida M., Kakuta S., Koyama T., Goto Y., Nagatake T., Igarashi O., Nagai S., Kiyono H., Iwakura Y., Kawalec M., Jean-Marc Reichhart J. M. and Sasakawa C., The role of a Tecpr1-dependent selective autophagy pathway in targeting bacterial pathogens. Cell Host & Microbe, 査読有、9、2011、P.376-389
- ④ Shinohara M., Uchida K., Shimada S. I., Tomioka K., Suzuki N., Minegishi T., Kawahashi S., Yoshikawa Y. and Ohashi N., Novel concentration method for detection of norovirus and sapovirus from water using minute particles of amorphous calcium phosphate. J. Med. Microbiol., 査読有、60、P.780-786
- ⑤ Hiroi M., Harada T., Kawamori F., Takahashi N., Kanda T., Sugiyama K., Masuda T., Yoshikawa Y. and Ohashi N., A survey of β -lactamase-producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka prefecture,

- Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 査読有、64、2011、P.153-155
- ⑥ Ogawa M., Yoshikawa Y., Mimuro H., Hain T., Chakraborty T. and Sasakawa, C., Autophagy targeting of *Listeria monocytogenes* and the bacterial countermeasure. Autophagy, 査読有、7、P.310-314
- ⑦ Kim M., Ashida H., Ogawa M., Yoshikawa Y., Mimuro H. and Sasakawa C., Bacterial interactions with the host epithelium. Cell Host & Microbe, 査読有、8、2011、P.20-35

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① Yamazaki M., Masuda R., Tanaka M., Serizawa T., Murakami T., Kobayashi Y., Yoshikawa Y., Masuda H., Hisada T. and Ohashi N., Identification of lactic acid bacteria in wasabi-dzuke and molecular analysis of human fecal microflora in the food intake., 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、パシフィコ横浜 (横浜)
- ② 呉東興、烏日図、高娃、川森文彦、吉川悠子、大橋典男、静岡県の野性シカが保有するリケッチア関連細菌群の解析、第19回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー (SADI) つつがの里大会、2011年11月5日、川・森文化交流センター (広島)
- ③ 篠原美千代、富岡恭子、峯岸俊貴、鈴木典子、内田和江、島田慎一、河橋幸恵、岸本剛、吉川悠子、大橋典男、野田衛、非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス検出法、第32回日本食品微生物学会学術総会、2011年10月7日、タワーホール船堀 (東京)
- ④ 高娃、烏日図、呉東興、古川英嗣、吉川悠子、川森文彦、大橋典男、Human infection with *Anaplasma phagocytophilum* in Japan., 第94回日本細菌学会関東支部総会、2011年10月6日、北里大学白金キャンパス (東京)
- ⑤ Murakami T., Tanaka M., Masuda R., Yamazaki M., Kobayashi Y., Serizawa T., Yoshikawa Y. and Ohashi N., Development of new method for classification of lactic acid bacteria using whole-cell MALDI-TOF MS., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月9日、札幌コンベンションセンター (札幌)
- ⑥ Yamazaki M., Masuda R., Tanaka M., Serizawa T., Murakami T., Kobayashi Y., Yoshikawa Y., Masuda H., Hisada T. and Ohashi N., Evaluation of Wasabi-dzuke (sake lees containing wasabi) as human probiotics., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月9日、札幌コンベンションセンター (札幌)
- ⑦ Wurutu, Wu D., Yoshikawa Y., Furukawa E., Murakami T., Minato C., Kawamori F., Ohtake M., Ohashi M. and Ohashi N., Molecular epidemiological study of *Rickettsiales* bacteria in wild deer and mice in Shizuoka prefecture, Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月9日、札幌コンベンションセンター (札幌)
- ⑧ Gaowa, Wurutu, Aochi M., Kawamori F., Yoshikawa Y. and Ohashi N., Molecular detection of *Rickettsiales* bacteria from ticks in western Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月9日、札幌コンベンションセンター (札幌)
- ⑨ 山崎芽生、芹澤委子、増田竜也、村上拓也、田中実穂、吉川悠子、久田貴義、富田順子、増田英樹、大橋典男、わさび漬けに存在する乳酸産生菌群の解析、日本乳酸菌学会2011年度大会、2011年7月11日、関西大学千里山キャンパス (大阪)
- ⑩ 田中実穂、吉川悠子、村上拓也、山崎芽生、芹澤委子、増田竜也、小林靖尚、大橋典男、炎症性腸疾患の緩和に有効な乳酸菌探索のための *in vivo* イメージング法の検討、日本乳酸菌学会2011年度大会、2011年7月11日、関西大学千里山キャンパス (大阪)
- ⑪ 村上拓也、田中実穂、増田竜也、山崎芽生、渡邊茉純、芹澤委子、吉川悠子、大橋典男、MALDI-TOF MSを用いた乳酸菌種の新規同定法に関する研究、日本乳酸菌学会2011年度大会、2011年7月11日、関西大学千里山キャンパス (大阪)
- ⑫ 吉川悠子、大橋典男、*Listeria monocytogenes* のオートファジー認識システムからの回避機構の解明、第18回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー (SADI) トキの里大会、2010年6月13日、トキ交流会館 (新潟)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 悠子 (YOSHIKAWA YUKO)
 静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
 研究者番号：00580523