

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390106

研究課題名(和文)細菌が分泌するカスパーゼ-1活性化抑制エフェクターの機能

研究課題名(英文)The bacterial effector-mediated inhibition of caspase-1 activation

研究代表者

鈴木 敏彦 (SUZUKI, Toshihiko)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10292848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、III型分泌装置(T3SS)による腸炎ビブリオによる新しい免疫回避の分子機構を解明することを目的とした。これまでに、NLRC4インフラマゾーム活性化を負に制御する腸炎ビブリオのT3SSエフェクターを2種類同定し、それらの細胞内の機能を明らかにした。エフェクターのひとつVopQは細胞内のオートファジーを誘導し、もうひとつのエフェクターVopSは低分子量GTPaseRhoファミリー分子を不活化することによって、それぞれ相加的にNLRC4インフラマゾーム活性化を抑制していた。NLRC4インフラマゾーム活性化に干渉する細菌のエフェクターの同定は今までに報告がなく、全く新規な機能であった。

研究成果の概要(英文)：In this work we found that both the NLRP3 and NLRC4 inflammasomes are activated by thermostable direct hemolysins (TDHs) and type III secretion system 1 (T3SS1) in response to *V. parahaemolyticus* infection. The activated inflammasomes then triggers the activation of caspase-1, a cysteine protease that is essential for IL-1 $\beta$  processing and release. However, the bacteria also have a function to suppress inflammasome activation via T3SS1. We identified T3SS1 secreted effector proteins, VopQ and VopS, prevent mainly NLRC4 inflammasome activation. VopQ and VopS induce autophagy and the inactivation of Rho GTPases, including Cdc42, respectively, and these cellular events interfere with the assembly of specks, the platform of inflammasome activation. Collectively, T3SS1 effector-based suppression of inflammasome activation may provide important insights into bacterial strategies for evading inflammasome-mediated host immune responses.

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：インフラマゾーム カスパーゼ-1 腸炎ビブリオ エフェクター 免疫回避

## 1. 研究開始当初の背景

ビブリオ属細菌の中で、ヒトに病原性を示す菌種は現在 12 種類あるとされている。これらの病原性ビブリオは、引き起こす疾患の種類によって 1) 腸管感染症と、2) 敗血症および創傷感染を引き起こす菌種の 2 つに大別することができる。1) のカテゴリーとしてコレラ菌と腸炎ビブリオが、2) のカテゴリーとしてビブリオ・バルニフィカスが知られている。

腸炎ビブリオは、汚染海産物の生食を介して腸管に感染し、下痢・発熱といった炎症性腸炎を引き起こす。この病態には耐熱性溶血毒 (Thermostable direct hemolysin: TDH) や 2 種類の III 型分泌機構 (Type 3 secretion system: T3SS、T3SS-1 と T3SS-2 がある) が関与すると報告されているが、詳細な病態形成のメカニズムは未だ解明されていない。最近、本菌の T3SS を介して分泌されるエフェクターの機能が徐々に明らかになり、これらが細胞・腸管毒性に関与すると考えられている。一方で、感染に伴って誘導されるインターロイキン (IL) -1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインが腸管の炎症に関与すると報告されており、菌の感染によって誘導される局所の免疫応答が、腸炎ビブリオ感染による腸管炎症の一因であると推定されている。しかし、宿主細胞内で発現すれば容易に分泌される TNF- $\alpha$  と異なり、活性化・分泌機構が複雑な IL-1 $\beta$  がどのように誘導されるのか解明されていなかった。

IL-1 $\beta$  は IL-18 とともに、生物活性のない前駆体として細胞内に存在するが、これを切断して活性化体に変換する因子がカスパーゼ-1 である。カスパーゼ-1 自体も通常状態では細胞質中で不活化体として存在するが、細胞への刺激で活性化され、炎症性の細胞死を誘導することが知られている。さらに、カスパーゼ-1 活性を制御するのが Nod 様受容体であることが近年明らかになり、特に細菌感染に関連するのが NLRP3、NLRC4、AIM2 および ASC である。このように、感染を引き起こす Nod 様受容体-カスパーゼ-1 活性化-サイトカイン活性化という 3 つのステップが細胞内で存在することがわかってきた。

腸炎ビブリオが感染したマクロファージにおいても、耐熱性溶血毒 (TDH、A と S の 2 種類) が NLRP3 を活性化し、一方で T3SS-1 が NLRP3 と NLRC4 両方を活性化することを見出した。一方で、T3SS-1 を構成する遺伝子クラスターには、複数の病原性分泌タンパク「エフェクター」がコードされている。申請者が、エフェクターコード領域を欠損した株を用いて NLRC4 経路を解析してみると、驚いたことに、カスパーゼ-1 の活性化が顕著に亢進することを見出した。これらの知見から、腸炎ビブリオには「カスパーゼ-1 活性化抑制エフェクター」が存在し、宿主自然免疫から回避する機構があるという仮説を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

腸炎ビブリオの T3SS-1 を介して分泌される「カスパーゼ-1 活性化抑制エフェクター」を同定し、その機能を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) カスパーゼ-1 活性化を抑制する T3SS-1 エフェクターの同定

- ① 各種遺伝子欠損株の作製
- ② 欠損株のマクロファージへの感染とカスパーゼ-1 活性化の解析
- ③ 各種 NLR ノックアウトマウス由来のマクロファージにおける活性化

(2) エフェクターの細胞内標的分子の同定とその細胞内機能の解析によるカスパーゼ-1 活性化抑制機構の解明

- ① プルダウンあるいは酵母 two-hybrid 法による細胞内標的分子の同定
- ② 標的分子の細胞内挙動の解析
- ③ 標的分子の欠損細胞の作製と解析
- ④ エフェクターホモログの検索と解析

(3) マウス感染モデルを用いた評価系の確立とカスパーゼ-1 活性化抑制エフェクターの in vivo での機能解明

- ① 腸管感染モデルの試作
- ② エフェクター欠損株の感染と解析

## 4. 研究成果

腸炎ビブリオの感染に伴うカスパーゼ-1 活性化の分子メカニズムを解析した結果、神奈川現象の本体である耐熱性毒素 TDH が NLRP3 を、III 型分泌装置 T3SS-1 が NLRP3 と NLRC4 両方を活性化することを見出した。さらに本菌の T3SS-1 から分泌されるエフェクターが主に NLRC4 インフラマゾームの活性化を特異的に阻害することから、このエフェクターの同定と NLRC4 活性化に対する阻害効果のメカニズムの解明を目指した。解析の結果、2 つのエフェクター VopQ および VopS を同定した。VopQ はマクロファージ内でオートファジーを、また VopS は RhoGTPase の不活化を誘導し、それらが NLRC4 活性化を抑制することを明らかにした。これらの結果は、腸炎ビブリオが感染時に誘導されるインフラマゾームを T3SS 依存的に抑制することによって、宿主免疫による菌の排除を回避する機構を有することを示唆している。

## 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 8 件)

- ① Toma C, Murray GL, Nohara T, Mizuyama M, Koizumi N, Adler B, Suzuki T. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages.

Cell Microbiol 印刷中、査読有  
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1462-5822](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1462-5822)

- ② Suzuki S, Franchi L, He Y, Muñoz-Planillo R, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C, Núñez G. (2014) *Shigella* Type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlrc4 inflammasome activation independently of Pkc  $\delta$ . **PLOS Pathog** 10: e1003926. 査読有  
doi:10.1371/journal.ppat.1003926.
- ③ King AM, Pretre G, Bartpho T, Sermswan RW, Toma C, Suzuki T, Eshghi A, Picardeau M, Adler B, Murray GL. (2014) High temperature protein G (HtpG) is an essential virulence factor of *Leptospira interrogans*. **Infect Immun** 82: 1123-1131. 査読有  
doi:10.1128/IAI.01546-13.
- ④ Higa N, Toma C, Koizumi Y, Nakasone N, Nohara T, Masumoto J, Kodama T, Iida T, Suzuki T. (2013) *Vibrio parahaemolyticus* effector proteins suppress inflammasome activation by interfering with host autophagy signaling. **PLOS Pathog** 9: e1003142. 査読有  
doi:10.1371/journal.ppat.1003142
- ⑤ Higa N, Toma C, Nohara T, Nakasone N, Takaesu G, Suzuki T. (2013) Lose the battle to win the war: bacterial strategies for evading host inflammasome activation. **Trends Microbiol** 21: 342-349. 査読有  
doi:10.1016/j.tim.2013.04.005.
- ⑥ Koizumi Y, Toma C, Higa N, Nohara T, Nakasone N, Suzuki T. (2012) Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection. **Cell Microbiol** 14: 149-154. 査読有  
doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01707.x
- ⑦ Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. (2011) Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. **Cell Microbiol** 13: 1783-1792. 査読有  
doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01660.x
- ⑧ Nakasone N, Toma C, Higa N, Koizumi Y, Ogura Y, Suzuki T. (2011) Detergents enhance EspB secretion from *Escherichia coli* strains harboring the locus for the enterocyte effacement (LEE) gene. **FEMS Microbiol Lett** 315: 109-114. 査読有

doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02176.x

[学会発表] (計 14 件)

- ① 鈴木志穂、Luigi Franchi, Yuan He, Raul Muñoz-Planillo, 三室仁美, 鈴木敏彦, Naip2は赤痢菌MxiIを認識しNlrc4 inflammasomeを活性化する、第87回日本細菌学会総会、2014年03月26日～2014年3月28日、東京
- ② 仲宗根昇、比嘉直美、Claudia Toma、高江洲義一、野原敏次、鈴木敏彦、沖縄近海からとれた海洋産物による細菌のIII型分泌機構阻害、第87回日本細菌学会総会、2014年03月26日～2014年3月28日、東京
- ③ Claudia Toma, Gerald L. Murray, Naomi Higa, Noboru Nakasone, Toshitsugu Nohara, Giichi Takaesu, Nobuo Koizumi, Ben Adler, Toshihiko Suzuki, Analysis of the bacterial factors involved in *Leptospira interrogans* -macrophage interactions, 8th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society, 2013年10月08日～2013年10月11日、福岡
- ④ Amy M. King, Gabriela Pretre, Thanatchaporn Bartpho, Rasana W. Sermswan, Claudia Toma, Toshihiko Suzuki, Mathieu Picardeau, Ben Adler, Gerald L. Murray, High temperature protein G (HtpG) is essential for acute leptospirosis in hamsters, 8th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society, 2013年10月08日～2013年10月11日、福岡
- ⑤ 仲宗根昇、比嘉直美、トーマ・クラウディア、高江洲義一、野原敏次、鈴木敏彦、細菌のIII型分泌機構を阻害する沖縄県海域に生息する海産物の調査、第66回日本細菌学会九州支部総会、2013年9月6日～2013年9月7日

- ⑥ 鈴木敏彦、病原体感染におけるインフラマゾーム活性化、沖縄感染免疫シンポジウム（招待講演）、2013年07月31日～2013年07月31日、沖縄
- ⑦ 鈴木敏彦、インフラマゾーム活性化と慢性炎症疾患との接点、第3回糖尿病治療の新時代～基礎と臨床を学ぶ～（招待講演）2013年7月5日、大阪
- ⑧ 鈴木敏彦、細菌感染とNod-like receptor、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日～2013年3月20日、千葉
- ⑨ クラウディア・トーマ、比嘉直美、仲宗根昇、野原敏次、小泉信夫、鈴木敏彦、*Leptospira interrogans*とマクロファージの相互作用に関与している病原因子の解析、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日～2013年3月20日、千葉
- ⑩ 仲宗根昇、比嘉直美、高江洲義一、野原敏次、トーマ・クラウディア、鈴木敏彦、下痢原性大腸菌の3型分泌装置を阻害する植物抽出物の発見、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日～2013年3月20日、千葉
- ⑪ 比嘉直美、クラウディア・トーマ、仲宗根昇、鈴木敏彦、Effector proteins secreted via T3SS1 of *Vibrio parahaemolyticus* interfere with inflammasome activation、第42回日本免疫学会学術総会、2012年12月5日～2012年12月7日、神戸
- ⑫ 鈴木敏彦、NLR活性化と病原体感染とのかかわり、第40回日本臨床免疫学会（招待講演）、2012年9月27日～2012年9月29日、東京
- ⑬ Suzuki T, Caspase-1-mediated host immune responses triggered by inflammasome upon bacterial infection. 第85回日本細菌学会総会国際シンポジウム、2012年3月27日～2012年3月29日、長崎

- ⑭ Suzuki T, Bacterial infection and inflammasome activation mediated by NOD-like receptors. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月6日～2011年9月10日、札幌

〔図書〕（計 4 件）

- ① 中込治、神谷茂編集（鈴木敏彦、他執筆）、医学書院、標準微生物学、2014、印刷中
- ② 鈴木敏彦、羊土社、実験医学 7月号特集「インフラマゾーム」、2012、1070-1735
- ③ 小泉由起子、鈴木敏彦 医学の門社、細菌感染による NLRP3 および NLRC4 を介したインフラマゾーム活性化、感染・炎症・免疫、2012、332-334
- ④ 小泉由起子、比嘉直美、鈴木敏彦 医学書院、細菌感染による NLRP3 および NLRC4 を介したインフラマゾーム活性化、生体の科学 2011、62:182-187

〔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

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/bacteriology>

2013年2月5日にプレス発表

翌2月6日に琉球新報、沖縄タイムスに掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 敏彦 (SUZUKI, Toshihiko)  
 琉球大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：10292848

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：