

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370049

研究課題名(和文)赤痢菌エフェクターの複合体構造解析による感染機構の解析

研究課題名(英文)Structural analyses of bacterial effectors and their mechanisms of infection

研究代表者

水島 恒裕 (MIZUSHIMA, TSUNEHIRO)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：90362269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢菌はエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞に分泌し、宿主の持つ防御機構を妨げることで感染を拡大している。我々は本研究により、炎症シグナル経路の制御に重要なTRAF6の活性化に必要なユビキチン結合酵素(Ubc13)を阻害するエフェクターOspIの構造解析を行い、OspIの触媒活性機構および標的タンパク質の特異的な認識機構を明らかにした。また、宿主のユビキチン経路を利用して免疫反応を阻害するエフェクターであるIpaHの結晶化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic bacteria such as Shigella, EPEC, and Salmonella deliver a variety of virulence factors, called effectors, into host cells via the type III secretion system. These effectors mimic or hijack host proteins and modulate host signaling pathways to promote bacterial infection. OspI, a Shigella flexneri effector, is a glutamine deamidase that selectively deamidates the glutamine residue at position 100 in Ubc13 to a glutamic acid residue. This modification inhibits the E2 ubiquitin conjugating activity, which is required for TRAF6 activation. To elucidate the molecular mechanisms of OspI, we determined the crystal structures of OspI mutant and its complex with Ubc13. These structures provide the substrate recognition and catalytic mechanism.

研究分野：構造生物学

キーワード：エフェクター 赤痢菌 X線結晶構造解析 ユビキチン経路

1. 研究開始当初の背景

赤痢菌は粘膜上皮細胞を介して感染・定着し炎症性下痢を引き起こす病原体である。世界では開発途上国を中心に年間の死者は100万人に上り、近年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。また、赤痢菌の感染はO157やサルモネラ属菌などと同様に、III型分泌装置を通じてエフェクターと呼ばれる病原因子が宿主細胞に分泌されることで成立することが知られている。赤痢菌の感染において、これらエフェクターの役割に関する研究は国内、国外で積極的に行われており、これまでにIcsBは感染に伴うオートファジーの活性化を回避する役割を持ち、IpaHファミリーはユビキチンリガーゼ活性により炎症反応を抑制することで感染持続に寄与しているなど、さまざまな感染戦略が解明されてきた。また、赤痢菌エフェクターがユビキチン-プロテアソーム経路の阻害や分解システムの利用を感染戦略として用いていることが報告された。我々はこれまでユビキチン-プロテアソームタンパク質分解経路に関わる酵素群を反応状態である複合体として構造を決定し、機能解析を行ってきたことから、ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解経路を制御し感染を拡大する、エフェクターの構造、機能および制御機構の理解を目指した。

2. 研究の目的

(1) OspIの構造、機能解析

OspIはCysプロテアーゼである脱ユビキチン化酵素と高いアミノ酸配列相同性を示す、新規エフェクターである。その機能の理解を目指し野生型の結晶構造解析を行ったが、活性部位と考えられるCys62が触媒部位近傍のCys65とジスルフィド結合を形成し、その構造は不活性型であった。そのため、OspIの活性発現機構の理解、エフェクターとしての機能発現機構の解明を目的とした。

(2) 赤痢菌ユビキチンリガーゼIpaHファミリーの立体構造および反応機構解析

IpaHファミリーはユビキチンリガーゼとして、免疫反応の進行に必要なタンパク質を宿主内の経路を利用して分解することで宿主の防御反応を阻害している。IpaHファミリーの全長および宿主標的タンパク質認識領域の構造解析を行うことにより、反応機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) OspI変異体(C62S、C62A)の結晶構造解析

OspI変異体(C62S、C62A)を、大腸菌発現系を用いて精製し、結晶化、構造解析を行う。得られたOspI変異体と立体構造既知の野生型OspIの活性部位構造を比較し、反応機構の解析を行った。

(2) OspI-標的タンパク質複合体構造解析による、感染機構の解析

OspIは宿主のユビキチン結合酵素である

Ubc13を標的とすることから、OspIとUbc13複合体を結晶構造解析すると共に、立体構造をもとに機能解析を行うことにより、OspIの基質認識機構の解析を行う。

(3) OspIによる感染機構の解析

OspIにより修飾されたUbc13の構造解析、機能解析を行い、赤痢感染における機能制御機構の解析を行う。

(4) IpaH9.8基質認識ドメインの構造解析

IpaH9.8は宿主細胞の炎症性サイトカイン遺伝子の発現に必要な転写因子NF- κ Bの活性化に関わるNEMO(NF- κ B essential modulator)をユビキチン化修飾し、分解へと導く。IpaH9.8の基質認識部位の構造解析を行い、特異的な基質認識機構の解析を行う。

(5) IpaH1880の結晶構造解析

IpaH1880は10種類存在するIpaHファミリーの中で、自己ユビキチン化活性が低く他のファミリーとは異なる特性を持つ。IpaH1880のX線結晶構造解析、X線小角散乱により、IpaHファミリーによる活性調節機構の解析を行う。

4. 研究成果

(1) OspIの構造、機能解析

OspI C62A変異体の結晶構造解析

OspIは基質であるUbc13の100番目のGln残基の側鎖を脱アミド化することによりGluに変異させる機能を持つ。しかし、野生型OspIでは結晶化中に不活性状態をとっていることから、触媒活性残基であるCys62をAlaに変異したOspIを用いX線結晶構造解析を行った。OspI C62A変異体は分解能3.0Åで立体構造を決定した(図1)。OspI C62A変異体の全体構造は野生型と同様であったが、活性部位の構造は野生型と異なり、触媒3残基の配置は一般的なCysプロテアーゼ(AvrPphB)と一致した(図2)。本構造解析結果よりOspIの脱アミド化反応における反応機構が示唆された。また、OspI C62S変異体を用いたX線結晶構造解析もを行い、2.2Å分解能で立体構造の決定に成功した。

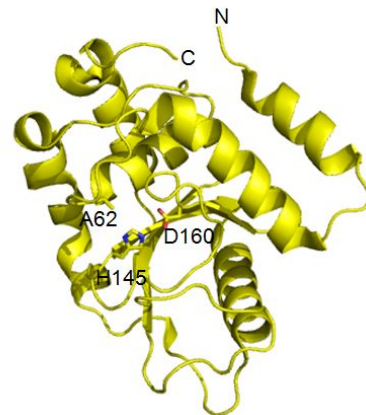


図1. OspI C62A変異体の立体構造

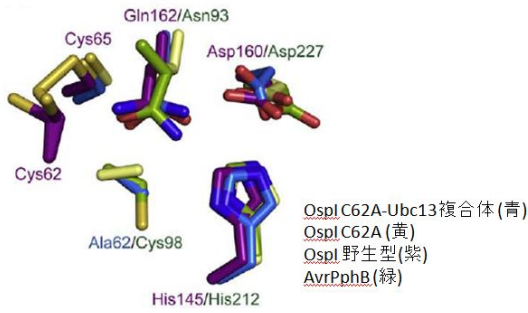


図 2. OspI 野生型および変異体の活性部位残基

OspI-Ubc13 複合体の構造および機能解析
 OspI と宿主内標的タンパク質 Ubc13 の複合体結晶構造解析を行った。OspI は Ubc13 と複合体を形成し、脱アミド化修飾を行った後、Ubc13 を解離する。そのため、野生型の OspI では Ubc13 との安定な複合体を形成しない。そこで、OspI の活性部位変異体を用い Ubc13 との安定な複合体形成条件を解析し、その結果を基に OspI C62A 変異体を用いて Ubc13 との複合体結晶構造解析を行った。OspI C62A-Ubc13 複合体構造は 2.96Å 分解能で立体構造を決定し、複合体構造より Ubc13 の Gln100 の側鎖が OspI の活性部位に向かって伸びていることを示した(図 3)。

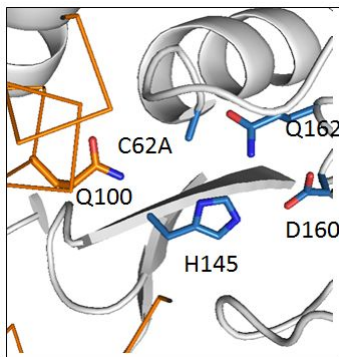
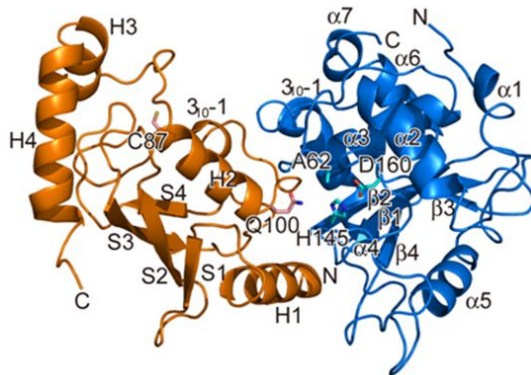


図 3. OspI C62A-Ubc13 複合体構造と相互作用部位の拡大図

この時、OspI の活性部位は OspI C62A 単独状態と同様の構造をとっていた(図 2)。

また、立体構造に基づき行った変異体を用い

た相互作用の解析より、OspI と Ubc13 は疎水性相互作用と電荷的な相補性による 2 種類の異なる相互作用により複合体を形成していることを示した(図 4)。

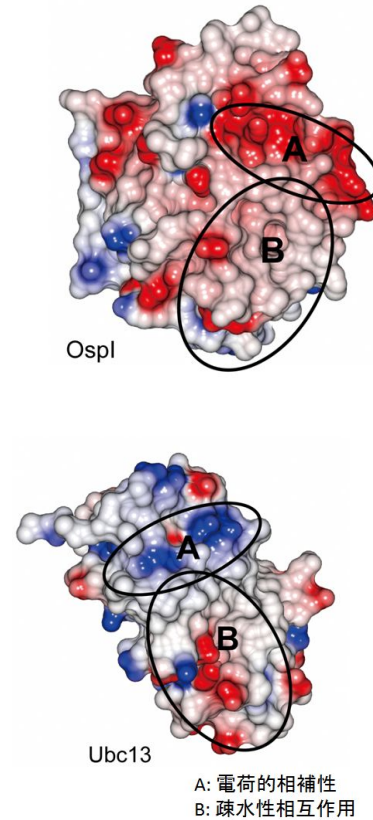


図 4. OspI と Ubc13 の複合体界面の表面電荷 (結合に関わる部位を丸で表示)

Ubc13 は OspI 以外に、TRAF6 や CHIP などのユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素 OTUB1 との複合体構造が報告されている。そこで、複合体形成様式を比較した結果、これらのタンパク質は疎水性相互作用のみで Ubc13 と結合しており、OspI とは異なる認識機構をとることが示された。TRAF6、CHIP、OTUB1 は Ubc13 以外の E2 酵素(UbcH5a)とも結合することが報告されているのに対し、OspI は UbcH5a とは結合しない(図 5)。このことから OspI の電荷の相補性による相互作用は特異性の獲得に寄与していると考えられる。赤痢菌エフェクターの中には宿主の UbcH5a を利用するユビキチンリガーゼ IpaH ファミリーが存在することから、OspI は IpaH の機能を阻害することなく、Ubc13 を翻訳後修飾するために適した反応機構をとっているものと考えられる。

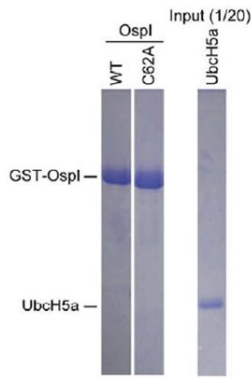


図5 OspI と UbcH5a の相互作用

脱アミド化 Ubc13 の構造および機能解析
 Ubc13 は TRAF6 の活性化に必須のコピキチン結合酵素であり、OspI による Ubc13 の脱アミド化修飾は TRAF6 の活性化に必要な自己コピキチン化を阻害する。Ubc13 の脱アミド化による TRAF6 活性化の阻害機構を解明するため、脱アミド化修飾された Ubc13 (Ubc13 Q100E) の X 線結晶構造解析を行い、2.65 Å 分解能で立体構造を決定した(図 6)。また、Ubc13 Q100E と TRAF6 は直接結合しないことを示すことにより、Ubc13 の脱アミド化による TRAF6 経路の阻害機構を示した。

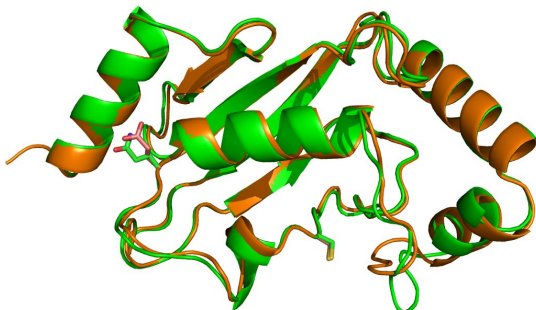


図 6 野生型 Ubc13(緑)と脱アミド化修飾型 Ubc13(オレンジ)の構造比較

(2) IpaH ファミリーの構造、機能解析

IpaH9.8 基質認識ドメインの構造解析
 IpaH ファミリーは N 末側の基質認識ドメイン、C 末側のユビキチンリガーゼドメインから形成される病原性細菌に特有のユビキチンリガーゼである。IpaH9.8 のユビキチンリガーゼドメインの立体構造はこれまでに報告されているが、基質認識ドメインの立体構造は未知である。IpaH9.8 基質認識ドメインの大腸菌発現系を構築し、精製、結晶化を行った(図 7)。さらに、作製した結晶を用い SPring-8 BL44XU ビームラインで X 線回折実験を行い、分解能 2.0Å でデータを収集した。その結果、IpaH9.8 基質認識ドメイン結晶は空間群 C222₁ に属し、格子定数は $a=68.3$, $b=105.0$, $c=61.6$ Å であった。

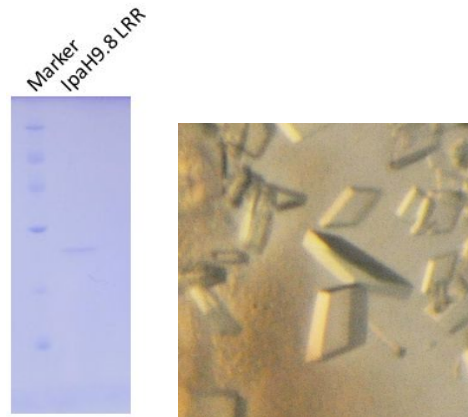


図 7 IpaH9.8 基質認識ドメインの SDS-PAGE と結晶

IpaH1880 の結晶構造解析

IpaH1880 全長の大腸菌発現系を構築し、精製、結晶化を行った(図 8)。作製した結晶は SPring-8 BL44XU ビームラインで X 線回折実験を行い、分解能 3.7Å でデータを収集した。

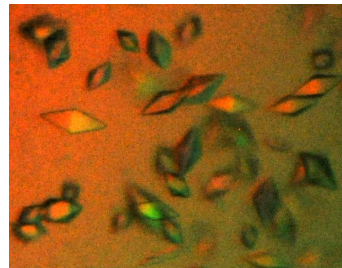


図 8 IpaH1880 の結晶

また、溶液状態での活性調節機構を理解するため、精製した IpaH1880 を用い、X 線小角散乱実験を行った。

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)

Kim M, Otsubo R, Morikawa H, Nishide A, Takagi K, Sasakawa C, Mizushima T, Bacterial effectors and their functions in the ubiquitin-proteasome system: insight from the modes of substrate recognition., *Cells.*, 3, 2014, 648-864. 査読有
 DOI: 10.3390/cells3030848.

Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, Mimuro H, Kim M, Ashida H, Akakura R, Yoshida M, Kawalec M, Reichhart JM, Mizushima T, Sasakawa C., The Shigella OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection. *Cell Host Microbe.*, 13, 2013, 570-583. 査読有
 DOI: 10.1016/j.chom.2013.04.012.

Nishide A, Kim M, Takagi K, Himeno A,

Sanada T, Sasakawa C, Mizushima T, Structural basis for the recognition of Ubc13 by the *Shigella flexneri* effector OspI. *J Mol Biol*, 425, 2013, 2623-2631. 査読有
DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.037.

Sanada T, Kim M, Mimuro H, Ashida H, Ogawa M, Mizushima T, Sasakawa C., A bacterial effector targets the TRAF6-NFκB pathway to modulate the acute inflammatory response to bacterial invasion of epithelial cells. *Virulence*, 3, 2012, 518-521 査読無
DOI: 10.4161/viru.21451.

〔学会発表〕(計 10 件)

Nishide, A., Kim M, Takagi, K., Himeno, A., Sanada, T., Sasakawa, C., Mizushima T, Structural Basis for the Recognition of Ubc13 by the *Shigella flexneri* Effector OspI, The Annual Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo, Mar. 16-17, 2015, 先端科学技術支援センター (兵庫県赤穂郡上郡町)

水島恒裕、赤痢菌病原因子の構造解析による作用機構の解明と創薬への応用、平成 26 年度東京大学医科学研究所共同研究拠点成果報告会、2015 年 3 月 6 日、東大医科研 (東京都港区)

Nishide, A., Kim M, Takagi, K., Himeno, A., Sanada, T., Sasakawa, C., Mizushima T, Structural Basis for the Recognition of Ubc13 by the *Shigella flexneri* Effector OspI, Symposium for young ubiquitin researchers in Japan “New Era in the Ubiquitin Research”, Nov. 11-12, 2014, 国際高等研究所 (京都府木津川市)

Takagi, K., Nishide, A., Mizushima T, Structure and substrate recognition mechanism of IpaH9.8 LRR, Symposium for young ubiquitin researchers in Japan “New Era in the Ubiquitin Research” Nov. 11-12, 2014, 国際高等研究所 (京都府木津川市)

高木賢治、水島恒裕、赤痢菌エフェクター IpaH9.8 基質認識ドメインの X 線結晶構造解析、日本結晶学会、2014 年 11 月 1-3 日、東京大学 (東京都文京区)

Mizushima T, Structural analyses of bacterial effectors and their mechanisms of infection in the ubiquitin-proteasome system, 2nd International Picobiology Institute Symposium Development & Destruction, Oct. 9-10, 2014, 先端科学技術支援センター (兵庫県赤穂郡上郡町)

西出旭、水島恒裕、赤痢菌エフェクター-OspI の結晶構造解析による感染機構の解明～侵略する赤痢菌、その巧みな感染機構～、兵庫

県立大学 知の交流シンポジウム、2014、2014 年 9 月 24 日、姫路商工会議所 (兵庫県姫路市)

西出旭、Minsoo Kim、高木賢治、真田貴人、笹川千尋、水島恒裕、OspI-Ubc13 複合体構造解析による赤痢菌エフェクタータンパク質の E2 酵素認識機構、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12-14 日、とりぎん文化会館 (鳥取県鳥取市)

Nishide A., Kim M, Takagi K., Himeno A., Sanada T., Sasakawa C., Mizushima T, Structural basis for the recognition of Ubc13 by the *Shigella flexneri* effector OspI, The 35th Naito Conference, The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles, Jul. 9-12, 2013, シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道札幌市)

西出旭、高木賢治、Minsoo Kim、真田貴人、笹川千尋、水島恒裕、赤痢菌エフェクタータンパク質 OspI 活性中心の構造解析、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 20 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 1 件)

Mizushima T, Sanada, T., Kim M, Sasakawa, C., Crystal structure of *Shigella flexneri* effector OspI, *Spring-8 Research frontiers*, 2013, 総ページ数 162、24-25.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 恒裕 (MIZUSHIMA, Tsunehiro)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号：90362269

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

KIM MINSOO (KIM, Minsoo)
東京大学・医科学研究所・特任准教授
研究者番号：50466835