

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成 15 年度採択研究代表者

笹川 千尋

(東京大学医科学研究所 教授)

「病原細菌の粘膜感染と宿主免疫反応抑制機構の解明とその応用」

1. 研究実施の概要

赤痢菌は大腸粘膜の M 細胞から粘膜下へ侵入し、マクロファージへ感染し細胞を破壊して周囲の吸収上皮細胞へ侵入する。感染より炎症免疫反応が誘起されるが、赤痢菌は粘膜上皮内に定着し、最終的に炎症性下痢を引き起こす。赤痢菌をはじめとする粘膜病原細菌の多くは、III 型分泌装置を通じて一群のエフェクター蛋白質を宿主細胞へ分泌する。そこで、赤痢菌の分泌するエフェクターの分泌動態、細胞内極在および標的宿主因子との相互作用を解明し、本菌の感染機構を解明するとともに、自然免疫に干渉するエフェクター分子を同定し、これらを総合して本菌の感染戦略の本体を究明する。またこれらの知見を基に、安全な赤痢ワクチンおよび新しい治療・制御法の確立を目指す。

これまでの研究により、赤痢菌から宿主細胞へ分泌される約 30 のエフェクター蛋白質のなかには、感染の促進および自然免疫抑制に働くものが示されている。前年度、菌の上皮細胞侵入に中心的な役割を果たす新規エフェクターとして同定した IpgB1 は、宿主細胞内で RhoG に替わって、ELMO-Dock180 複合体の活性化を通じてラッフル膜を誘導する、あらたなシグナル伝達経路が本菌の細胞侵入に深く関わっていることを見いだした。VirA は細胞内へ侵入した赤痢菌から分泌され、微小管ネットワーク構造を破壊する活性を有するとともに、微小管自身が菌の細胞内移動に対して障害となることを見いだした。興味あることに、VirA は α チュブリンに対してシステインプロテアーゼ様の活性を発揮し、菌の細胞内移動にともない周囲の微小管を破壊する役割を担っていた。赤痢菌は腸管粘膜上皮内へ侵入し炎症を惹起する。赤痢菌から分泌される IpaB は III 型分泌装置の先端で宿主細胞膜へ小孔を形成するエフェクターとして働くことがこれまで知られていたが、本研究により IpaB の一部は細胞質から核内へ移行して、細胞周期を抑制する作用を示すことが明らかとなった。IpaB は核内でサイクリン B1 のユビキチンリガーゼ巨大複合体である APC/C の活性を負に抑制する Mad2l2 に特異的に結合し、その結果 Cdh1 活性化を通じて APC/C を活性化してサイクリン B1 の蓄積を抑制した。実際、ウサギ腸管へ赤痢菌を感染させると IpaB 依存的に、陰窩近傍の上皮前駆体細胞の増殖が顕著に抑制された。赤痢菌の染色体にはロイシンリッチリピートを有する 7 種のエフェクターと推定されるタンパク質をコードする遺伝子が存在する。本研究ではそれらがいずれも III 型分泌装置を通じて細胞内において赤痢菌から宿主細胞質へ分泌されている

ことを見いだした。これら一連のエフェクター様の全ての遺伝子を欠失させ、その変異赤痢菌のマウス致死活性への影響を調べた結果、それら遺伝子群の存在は本菌の感染に何らかの役割を果たしていることが強く暗示された。今後それらの役割とともに、本菌の上皮細胞侵入、細胞内のオートファジー回避、炎症反応抑制現象に関わる新規エフェクター機能をさらに追求する。また赤痢菌の感染初期における食細胞に対する細胞死誘導機構を解明し、低炎症性弱毒ワクチン開発に必要な基礎的知見を得る。

2. 研究実施内容

研究目的

赤痢菌をはじめとする多く病原細菌は粘膜面を介して感染・定着し様々な疾患を引き起こす。赤痢は大腸粘膜の M 細胞から粘膜下へ侵入し、マクロファージへ感染し細胞を破壊して周囲の吸収上皮細胞へ侵入する。赤痢菌の感染により強い炎症反応が誘起されるが、菌は粘膜上皮内に定着し周囲の上皮細胞へ感染を拡大する。近年、赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌が、III 型分泌装置を通じて一群のエフェクター蛋白質を宿主細胞へ分泌し、感染に必要な機能を宿主細胞から獲得していることが報告されている。しかし、それらエフェクターが菌の感染と定着にどこまで関わっているかは未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、赤痢菌の分泌するエフェクターの分泌動態、細胞内極在および標的宿主因子との相互作用を精査し、本菌の感染分子機構を解明するとともに、炎症および自然免疫に干渉するエフェクターを同定し感染における役割を明らかにすることを目的とする。本年度は、赤痢菌の宿主上皮細胞への侵入と拡散におけるエフェクターの役割に焦点をしばらく以下の研究を実施した。

方法および結論

(i) 赤痢菌の細胞侵入機構：

赤痢菌の上皮細胞侵入には、これまでにいくつかのエフェクターが関与していることが報告されていたが、本研究により菌の III 型分泌装置 (TTSS) を通じて上皮細胞へ分泌される IpgB1 の遺伝子を欠損させた菌の細胞侵入は野生株の 50% 以下へ低下することを報告した (JBC, 2005)。そこで、IpgB1 の細胞内機能を解明するために GST-IpgB1 を用いて HeLa 細胞中の結合タンパク質をプルダウンアッセイ法により探索した結果、ELMO に特異的に結合することが明らかとなった。ELMO は Dock180 と複合体を形成し、RhoG に繋がり膜へ結合すると Dock180 が GEF として Rac1 を活性化しラッフル膜を形成する。IpgB1 の ELMO-Dock180 複合体との結合が、赤痢菌の細胞侵入に関わるか否かを調べるために、ELMO および Dock180 の各々のドミナントネガティブ変異体を作成し HeLa 細胞へ発現させたところ、赤痢菌の IpgB1 依存的な細胞侵入およびラッフル形成が顕著に減弱した。同様に ELMO および Dock180 の発現を siRNA により抑制させると、赤痢菌の侵入およびラッフル形成も顕著に抑制された。IpgB1 を ELMO に結合させたキメラタンパク質は、RhoG と同様に ELMO-Dock180 複合体を膜へ移行し、ラッフル膜形成を誘導したことから、IpgB1 は RhoG 機能を代行して ELMO-Dock180 を活性化し、これにより Rac1 の活性化が起こることが重要であることが

示唆された。今後、IpgB1-ELMO-Dock180 複合体が赤痢菌の侵入にともない形成されるラッフル膜近傍で形成されているか、免疫電研、蛍光顕微鏡等で精査する。

(ii) 細胞内拡散機構:

細胞質内で赤痢菌は菌体の一極に VirG を集積し、VirG-N-WASP-Arp2/3 複合体を形成する。赤痢菌の細胞内移動は、*virG* 遺伝子を欠損させると完全に消失するが、野生株でも微小管 (MT) ネットワークにより移動が著しく妨げられ、MT による菌の細胞内移動阻害は *virA* 変異株でさらに増大することを見いだした。電子顕微鏡および共焦点顕微鏡で細胞内の赤痢菌を観察した結果、赤痢菌は TTSS を通じて分泌される VirA の MT 崩壊活性を利用して周囲の MT を切断しつつ移動していることが示唆された。VirA の MT 崩壊活性を調べる目的で、精製した VirA と α チュブリンおよび α チュブリンを混和したところ、VirA の量依存的に α チュブリンのみが切断された。VirA のモチーフ検索およびアミノ酸置換変異体の解析により、VirA はパパインに代表される Clan CA のメンバーに類似するシステインプロテアーゼの一種であることが明らかとなった。

(iii) 細胞周期抑制:

赤痢菌の TTSS から分泌される IpaB は宿主細胞の核内へ移行して細胞周期を抑制することを見いだした。核内で IpgB1 は細胞周期調節に関わる APC/C-Cdh1 を負に抑制する Mad2l2 へ結合した。IpaB-Mad2l2 結合をサイクリン B1 崩壊およびユビキチン化アッセイ法で精査した結果、APC/C-Cdh1 依存的なサイクリン B1 の崩壊が認められた。Mad2l2 への結合に必須な IpaB の 61 番目のアスパラギンをアラニンへ置換した変異体は、サイクリン B1 の崩壊および細胞周期抑制性が消失した。赤痢菌をウサギ腸管ループへ感染させ、感染後 12 時間後の陰窩近傍の腸管上皮前駆体細胞の増殖を抑制したが、IpaB の 61 番目のアラニン置換変異体を産生する変異株では回復した。これらの結果から、赤痢菌は腸管上皮細胞を増殖の足場として利用するために感染後期において陰窩近傍の前駆体細胞の細胞増殖を制御する能力を有していることが示唆された。

(iv) 赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用

赤痢菌は、M 細胞直下の常在マクロファージや樹状細胞へ侵入し、IpaB エフェクターを分泌してカスパーゼ 1 を活性化する。これによって、マクロファージの細胞死を伴う強い炎症が局所に惹起される。昨年、カスパーゼ 1 のノックアウトマウスの抗原提示細胞あるいは *ipaB* 欠損変異株でも、菌の抗原提示細胞質への移行により細胞死がやや遅れて誘導されることを見だし、菌体より遊離されるリピド A がその原因であることを示した (JBC, 2005)。興味あることに、リピド A により誘導される細胞死は TLR4 にも依存しない。そこで、リピド A による IpaB/カスパーゼ 1 に非依存的なマクロファージ細胞死誘導に関わる宿主因子として、Ipafl および ASC の関与について各々の欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いて精査した。その結果、ASC 欠損マウスにおいては、カスパーゼ 1 の活性化は消失したものの依然として細胞死が誘導された。今後この ASC の下流に存在すると考えられる未知の細胞死誘導に関わるシグナル伝達経路を同定する。

3. 研究実施体制

「笹川千尋」グループ

- ①研究分担グループ長：笹川 千尋（東京大学、教授）
- ②研究項目：赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究
免疫抑制に関わるエフェクターの研究
赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Ohya, K., Handa, Y., Ogawa, M., Suzuki, M. and Sasakawa, C. (2005) IpgB1 is a novel *Shigella* effector protein involved in bacterial invasion of host cells: ITS ACTIVITY TO PROMOTE MEMBRANE RUFFLING VIA RAC1 AND CDC42 ACTIVATION. *J. Biol. Chem.* 280, 24022-24034.
- Okuda, J., Toyotome, T., Kataoka, N., Ohno, M., Abe, H., Shimura, Y., Seyedarabi, A., Pickersgill, R. and Sasakawa, C. (2005) *Shigella* effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF35 to modulate host immune responses. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 333, 531-539
- Suzuki, T., Nakanishi, K., Tsutsui, H., Iwai, H., Akira, S., Inohara, N., Chamaillard, M., Nuñez, G. and Sasakawa, C. (2005) A novel caspase-1/Toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. *J. Biol. Chem.* 280, 14042-14050.
- Nagai, T., Abe, A. and Sasakawa, C. (2005) Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for the bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J. Biol. Chem.* 280, 2998-3011.
- Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. and Sasakawa, C. (2005) *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J. Biol. Chem.* 281, 599-607.
- Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T. and Sasakawa, C. (2005) Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J. Exp. Med.* 202, 1235-1247.
- Marchés, O., Batchelor, M., Shaw, R. K., Patel, A., Cummings, N., Nagai, T., Sasakawa, C., Carlsson, S. R., Cougoule, C., Caron, E., Knutton, S., Connerton, I. and Frankel, G. (2006) EspF of Enteropathogenic *Escherichia coli* Binds Sorting Nexin 9. *J. Bacteriol.* in press