

# 病原菌エフェクターによる宿主防御応答阻害機構の解明

兵庫県立大学大学院理学研究科生体分子生合成講座

水島 恒裕

## 研究目的

病原細菌はエフェクターと呼ばれる病原性タンパク質を宿主細胞に分泌し、宿主の防御応答を妨げることにより感染する。病原細菌は赤痢菌約50種、レジオネラ菌約300種のように多数のエフェクターを有し、多くが宿主のユビキチン修飾経路を標的としている。(図1) 近年、宿主には存在しない独自の構造や反応によりユビキチン経路を阻害するエフェクターが報告されており、本研究ではこれらエフェクターの反応機構を、エフェクターの立体構造に基づき解明することを目的とした。

ユビキチンによる翻訳後修飾は、特異的タンパク質分解・DNA修復・転写調節・免疫応答等を調節するシグナル伝達経路の制御において中核的な役割を担っている。ユビキチン修飾経路はユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の3種の酵素群から構成されており、ヒトでは約600種類存在するE3が特異的基質にユビキチンを付加することで、状況に応じ適切なシグナル伝達を行っている。また、病原細菌の感染に対する免疫応答の調節にもユビキチン化修飾は関与している。

腸管病原細菌による炎症性下痢は世界の5歳未満児死亡原因で肺炎に次いで多く、有効なワクチンのない病原菌の存在により発展途上国を中心に多数の死者を出している。また、腸管病原細菌の感染は近年の多剤耐性菌の出現により先進国においても問題となっており病原細菌の感染機構解明や治療法の開発は重要な研究課題である。腸管病原細菌は宿主への感染時にエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞内に分泌し、宿主の炎症応答・細胞接着・オートファジー等の防御経路を阻害することで感染可能な環境を作り上げる。ユビキチン経路を阻害するエフェクターの反応はリン酸化、脱アミド化、タンパク質分解等、多岐にわたり、ユビキチン経路で働くE3活性を持つエフェクターも複数存在している。これらE3機能を持つエフェクターは宿主のユビキチン経路を乗っ取り、宿主のユビキチンやE2を用いて免疫応答を制御するタンパク質をユビキチン化による特異的タンパク質分解経路へと導いている。病原細菌で見出されたNovel E3 ubiquitin

ligase (NEL)型E3は哺乳類等に存在しない構造的特徴を持つE3酵素であり、赤痢菌のIpaH1.4は宿主のユビキチン修飾経路を利用し、LUBAC複合体(HOIL-1L, HOIP, SHARPINから構成)をユビキチン化による分解へと導くことでNF- $\kappa$ Bによる炎症応答を阻害する。(図2) また、赤痢菌OspIは宿主に存在しない機能を持った脱アミド化酵素であり、ユビキチン経路で働くE2に対して翻訳後修飾を行う。さらに、SCF型E3の活性化因子NEDD8やユビキチンを脱アミド化修飾するCif等、病原細菌には特有の反応によりユビキチン経路を制御しているエフェクターが存在している。このように病原細菌エフェクターは独自の機能を持つことが報告されているが、その分子メカニズムの多くは未解明である。

そこで、本研究ではユビキチン経路を標的とした病原細菌エフェクターの感染機構の解明を目的としてIpaH1.4、IpaH2.5によるLUBACの認識およびユビキチン化修飾機構の解析、病原細菌に特有の反応によりユビキチン経路を制御するタンパク質の解析を行い、分子機構の解明を目指した。

## 研究内容

### (1) IpaH1.4-LUBAC複合体の構造解析

IpaH1.4とIpaH2.5はE3活性を持ち、LUBAC複合体のHOIL-1LとHOIPサブユニットと結合し、HOIPをユ

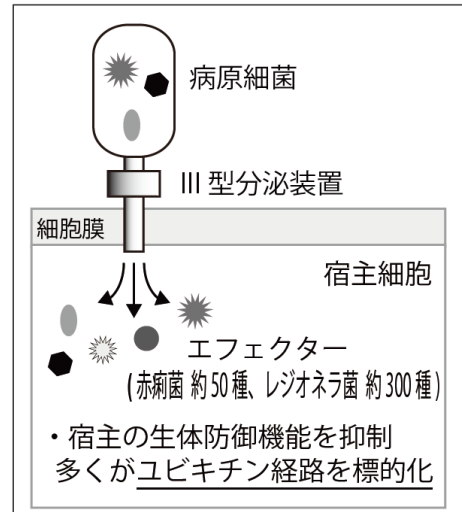


図 1. 病原細菌エフェクター

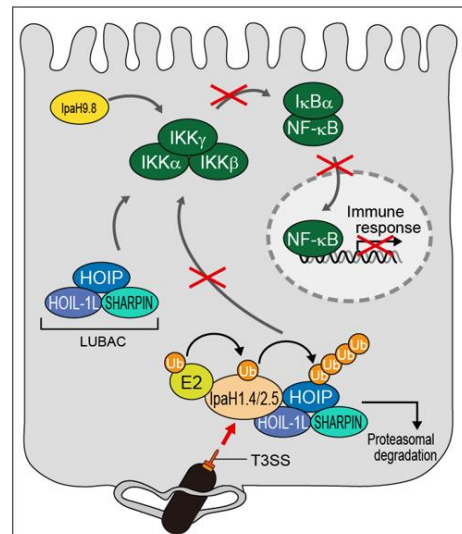


図 2. IpaH1.4 による宿主防御応答阻害機構

ビキチン化することによりプロテアソーム依存的に分解する。これによりNF- $\kappa$ Bによる免疫応答は阻害される。IpaH1.4のLUBACを標的とした感染機構の理解を目指し、IpaH1.4とLUBACの複合体構造解析を行うため、完全な複合体の発現系構築、LUBACの機能部位からなるpetit-LUBAC(HOIP(474-1072), HOIL-1L(1-191))とIpaH1.4の複合体の精製を行った。

#### (2) IpaH1.4およびIpaH2.5によるLUBAC認識機構の解析

赤痢菌にはNELドメインを持つNELファミリータンパク質が複数存在しており、感染の際にそれぞれ異なる宿主タンパク質を標的としてユビキチン化修飾を行い、宿主タンパク質を分解へと導くことで防御経路を阻害している。そこで、IpaH1.4およびIpaH2.5によるLUBACの特異的な認識機構の解明を目指し、IpaH1.4およびIpaH2.5の基質認識領域の特定、基質認識部位のX線結晶構造解析、変異体を用いた基質認識機構の解析を行った。

#### (3) NEL型ユビキチンリガーゼ(E3)の反応機構の解析

NELドメインは赤痢やサルモネラ等、複数の病原細菌に共通して存在するE3活性構造であり、ヒト等には存在しない病原細菌に独自のE3ドメインである。NELドメインの立体構造はこれまでに全長のIpaHタンパク質やドメインの状態では決定されているが、ユビキチン化活性発現のために形成するE2やユビキチンとの複合体構造は報告されておらず、機能発現のメカニズムは未解明である。そこで、病原細菌に特有なNELドメインの反応機構を解明することを目的として、NELドメインの活性部位にユビキチンが結合した、反応中間体状態の構造解析を行った。

#### (4) レジオネラエフェクターCifの構造解析

Cell inhibiting factor(Cif)は病原性大腸菌などに存在するエフェクターのひとつであり、Cullin RING E3(CRL)の活性化に関わるタンパク質NEDD8を脱アミド化修飾することにより、CRLの活性化を阻害することで細胞周期の進行を妨げる。Cifファミリーはシステインプロテアーゼ様の活性部位を持ちNEDD8を基質とするが、Cifファミリーの中にはNEDD8だけではなく、NEDD8と高いアミノ酸配列相同性を持つユビキチンに対しても脱アミド化活性をもつものが報告されている。しかし、CifによるユビキチンまたはNEDD8に対する認識特異性は明らかにされていない。そこで、Cifファミリーによる標的タンパク質の認識特異性の解明を目指し、立体構造既知のCifファミリーとは異なるアミノ酸配列の特徴を持ったレジオネラ由来のCif様タンパク質のX線結晶構造解析を行った。

#### (5) 出芽酵母および病原性酵母イソクエン酸リアーゼの構造解析

イソクエン酸リアーゼ(ICL)は植物や微生物に特有なグリオキシル酸回路で働く酵素であり、イソクエン酸からグリオキシル酸とコハク酸を生成する。出芽酵母のICL(ScICL1)はグルコースが豊富な場合、ユビキチン化修飾を介した分解制御を受ける。それに対し、病原性酵母である*Candida albicans*では細胞内に同様のE3が存在するにも関わらずICL(CaICL1)はユビキチン化修飾を受けない。病原性酵母は感染の際に多くのエネルギーを必要とすることから、そのエネルギーをグリオキシル酸回路から獲得している。そのため病原性酵母では、出芽酵母とは異なる調節機構によりグリオキシル酸回路を制御していると考えられる。本研究では、出芽酵母と病原性酵母の間で異なる、ICLのユビキチン化制御機構の理解を目指し、それぞれのICLの構造解析を行った。

## 研究結果

### (1) IpaH1.4-LUBAC複合体の構造解析

#### ①LUBAC複合体(HOIL-1L, HOIP, SHARPIN)の発現系構築

昆虫細胞発現系を用い、完全なLUBAC複合体の発現系を作製し、HOIL-1L, HOIP, SHARPINの発現を確認した。

#### ②IpaH1.4-petit-LUBAC複合体の電子顕微鏡観測

IpaH1.4全長とLUBACの機能部位からなるpetit-LUBACを複合体状態で精製し、負染色法を用いて電子顕微鏡像を測定した。

### (2) IpaH1.4およびIpaH2.5によるLUBAC認識機構の解析

#### ①IpaH1.4およびIpaH2.5のLUBAC認識部位の構造解析

IpaH1.4およびIpaH2.5は宿主のLUBAC複合体をユビキチン化修飾することにより分解へと導いている。これまでの研究よりIpaH1.4およびIpaH2.5により認識されるLUBACの領域は解析されているが、IpaH1.4やIpaH2.5の認識部位は示されていない。そこで、それぞれのタンパク質の欠質変異体を作製しpetit-LUBACとの相互作用解析からIpaH1.4およびIpaH2.5がロイシンリッチリピート(LRR)ドメインでpetit-LUBACと相互作用することを明らかにした。

さらに、IpaH1.4とIpaH2.5それぞれのLUBAC認識部位の発現系を用いてタンパク質の精製、結晶化を行い、X線結晶構造解析によりIpaH1.4とIpaH2.5のLRRドメインの立体構造をそれぞれ分解能1.4Å,3.4Åで決定した。(図3)

#### ②IpaH1.4によるLUBAC認識機構の解析

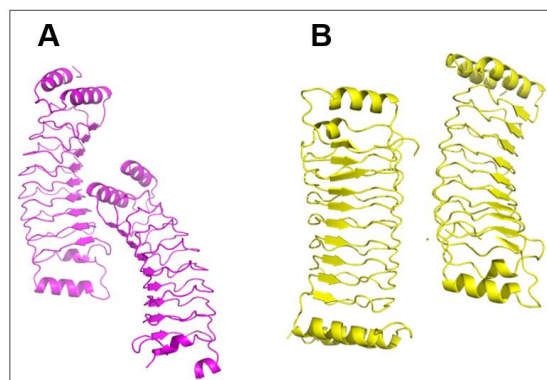


図3. IpaH1.4、IpaH2.5 LRR 結晶構造

A. IpaH1.4 LRR の非対称単位中の構造(2分子)

B. IpaH2.5 LRR の非対称単位中の構造(2分子)

IpaH1.4のLUBAC認識部位の立体構造を決定したことから、構造既知のNELファミリータンパク質と立体構造比較を行い、IpaH1.4やIpaH2.5に特有の性質を持つ領域を基質認識に関わる部位の候補と考えた。さらに、これらの部位に部位特異的変異を導入し、変異体タンパク質を用いた相互作用解析、petit-LUBACに対するユビキチン化活性を測定することにより、IpaH1.4のLUBAC認識部位を解析した。

### (3) NEL型ユビキチンリガーゼ(E3)の反応機構の解析

NELドメインはユビキチン化修飾反応において、活性化したユビキチンを宿主のE2酵素から自身の活性部位のCysに転移した後、標的タンパク質のLys残基に付加するE3酵素である。NELドメインの活性部位にユビキチンが付加した反応中間状態の構造解析を行うため、活性部位CysをLysに変異したIpaH1.4 NELドメイン変異体を作製し、NELドメインとユビキチンがイソペプチド結合した反応中間体の類似体複合体を精製し、結晶化、X線結晶構造解析を行った。その結果、IpaH1.4 NEL~ユビキチン複合体の立体構造を分解能2.3Åで決定した。

### (4) レジオネラエフェクターCifの構造解析

CifファミリーはNEDD8やユビキチンを脱アミド化修飾することにより、宿主の防御応答を阻害するエフェクタータンパク質である。CifはユビキチンよりNEDD8に対して、より高い脱アミド化活性を示すが、その差は病原細菌の種類によりそれぞれ異なっている。これまでに立体構造の報告された*Burkholderia pseudomallei*のCifでは立体構造に基づきNEDD8に対する高い親和性の理由が考察されているが、結合に関わるアミノ酸はCifファミリー内で保存されておらず、NEDD8とUbに対する認識の特異性は明らかになっていない。本研究では、Cifファミリー内で高く保存されNEDD8との相互作用に関わるアミノ酸残基に注目し、その部位が一般的なものとは異なるレジオネラ由来のCif様タンパク質を用い、X線結晶構造解析によりCifファミリーの持つ基質認識特性の解明を目指した。その結果、レジオネラ由来Cif様タンパク質の立体構造を分解能2.0Åで決定した。

### (5) 出芽酵母および病原性酵母イソクエン酸リアーゼの構造解析

#### ①出芽酵母イソクエン酸リアーゼ(ScICL1)の構造解析

大腸菌発現系を用いて培養したScICL1を精製、結晶化し、X線結晶構造解析により分解能2.3Åで立体構造を決定した。(図4) ScICL1はホモ四量体を形成し、それぞれのサブユニットはドメインI(アミノ酸残基番号10-274、373-536)とドメインII(アミノ酸残基番号275-372)の2つのドメインから形成されていた。ドメインIはTIMバレルと類似の構造であり、18個の $\alpha$ ヘリックスと、12個の $\beta$ ストランド、5個の $3_{10}$ ヘリックスからなり、ドメインIIは5個の $\alpha$ ヘリックス、2個の $\beta$ ストランドからなる逆並行 $\beta$ シートから形成されていた。また、ScICL1の全体構造はこれまでに立体構造の報告された、真核生物のICLとよく似ていたが、N末端側に位置する $\alpha 1$ ヘリックスの配向が立体構造既知のICLとは異なっていた。



図 4.出芽酵母 ICL1 の結晶構造

#### ②病原性酵母*Candida albicans*イソクエン酸リアーゼ(CaICL1)の構造解析

CaICL1の構造解析は低温電子顕微鏡(Cryo-EM)を用いた単粒子解析とX線結晶構造解析の手法を用いて行い、Cryo-EMによるアポ型構造は分解能2.63Å、基質類似体であるギ酸との複合体構造はX線結晶構造解析により分解能2.69Åで決定した。CaICL1の全体構造はScICL1や立体構造既知のICLと同様にホモ四量体構造をとり、各サブユニットは2つのドメインから形成されていた。しかし、Cryo-EMにより決定した立体構造では、 $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 17$ ,  $\alpha 19$ ,  $\alpha 20$ ,  $\alpha 21$ ,  $\alpha 22$ ,  $\alpha 23$ ,  $\eta 5$ ヘリックスの電子密度が不鮮明であり、溶液中ではこれらの領域がフレキシブルであることが示された。ICLに関するこれまでの構造学的な研究より、ICLは基質と結合することにより開状態から閉状態に変化することが知られている。しかし、アポ型のCryo-EM構造はX線結晶構造解析により決定された出芽酵母のアポ型構造よりフレキシブルな領域が大きく、溶液状態ではより自由度の高い構造状態をとることで、基質との結合や立体構造変化を行っていることが示唆された。

#### ③立体構造に基づく出芽酵母イソクエン酸リアーゼ(ScICL1)のユビキチン化修飾機構の解析

ScICL1は細胞内ではユビキチンリガーゼGID複合体によりユビキチン化修飾を受け、プロテアソームに分解される。この時、GID複合体はScICL1のN末端領域に結合し、ユビキチン化を行うことが報告されている。また、病原性酵母である*Candida albicans*にもGID複合体が存在しており、ScICL1のC末端領域を融合したCaICL1(CaICL1~Ubi)は細胞内で分解されるが、野生型のCaICL1は分解されない。そこで、ScICL1とCaICL1の立体構造を比較することにより、ユビキチン化修飾におけるScICL1とCaICL1の違いを考察した。その結果、ScICL1の予想されたユビキチン化修飾を受けるLys残基がCaICL1では5.9Å離れて位置すること、GID複合体の結合部位から続く $\alpha 1$ ヘリックスの配向がScICL1とCaICL1で約 $10^\circ$ 異なっていることが明らかになった。(図5) これらのことから、*Candida albicans*ではN末端領域にGID複合体が結合しても、適切な位置にLys残基が存在しないために、ユビキチン化修飾を介したタンパク質分解を受けないものと考えられた。

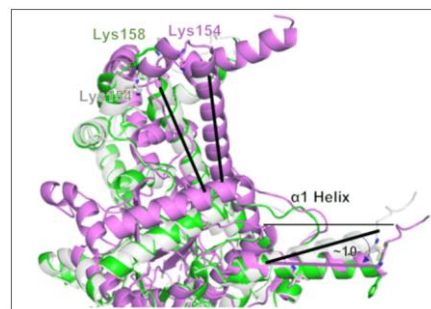


図 5.ユビキチン化の標的となる ScICL1 と CaICL1 の比較

緑 : ScICL1、灰色、ピンク : CaICL1

これらから、*Candida albicans*ではN末端領域にGID複合体が結合しても、適切な位置にLys残基が存在しないために、ユビキチン化修飾を介したタンパク質分解を受けないものと考えられた。