

# 病原細菌の感染機構および宿主免疫応答の解析

東京大学医科学研究所 細菌感染生物学 社会連携研究部門

鈴木 志穂

## 1. 目的 背景

赤痢菌、サルモネラ菌などの病原細菌の感染に対し、宿主は菌体をマクロファージに取り込んだ後、菌体由来分子を認識してNLRC4 inflammasomeを活性化させ炎症性サイトカインの産生・分泌を誘導し、最終的に激しい炎症応答を起こす。サルモネラ菌ではNLRC4 inflammasomeが主に鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンを特異的に認識して激しい炎症応答を引き起こすことが知られているが、赤痢菌のように鞭毛を持たない病原細菌は多く存在しており、NLRC4がどのようにしてこれら非鞭毛性病原細菌を認識することができるのかわかっておらず、研究命題とされてきた。これまでの報告によると、菌体の鞭毛を構成するフラジェリンタンパク質、病原性エフェクターを分泌するⅢ型分泌装置(T3SS)のrod proteinおよびneedle proteinが宿主のNLRC4経路を介して認識され炎症応答のトリガーとなる可能性が示唆されている (Franchi *et al.*, 2006, Nature; Miao *et al.*, 2010, PNAS; Franchi *et al.*, 2012, Nature immunology; Yang *et al.*, 2013, PNAS)。しかし、その一方で、NLRC4は複数の特定のリガンドを認識するが、リガンドとなる分子はわかりやすい共通点がある訳ではなく、NLRC4がどのようにしてこれら多岐にわたる分子を特異的に認識することができるのかわかっておらず、謎とされてきた。また、NLRsとリガンド間の直接結合はどのNLRsにおいても証明されない事から、これらを介在する未知の因子の存在が示唆されていた。ところが2011年に、アメリカと中国の研究チームがほぼ同時に、これらの謎に対する鍵となる分子を特定した (Kofoed and Vance, 2011, Nature; Zhao *et al.*, 2011, Nature)。それがNAIPsファミリータンパク質である。これらの論文によると、NAIP5がフラジェリンに、NAIP2がbacterial rod proteinに対しそれぞれ直接結合する。NAIP5とフラジェリンはNLRC4と高分子複合体を形成し、inflammasomeの活性化を引き起こす。現状では、既報の報告は実験が比較的容易なサルモネラ菌の研究例にとどまっており、赤痢菌のようにフラジェリンを持たない病原細菌も多く存在する事から、本報告のみで全ての説明がつくわけではないが、これらの報告から興味深い1つの仮説が推測される。それは、それぞれのNAIPファミリータンパク質が異なる細菌リガンドに対する結合能を有しアダプターとしての役割を担っており、inflammasome活性化を誘導するのではないかという仮説である。以上より、非鞭毛性病原細菌を認識するために機能するNAIPがフラジェリンを認識するNAIP5とは別に存在する事を示唆している。2011年の論文は、その後国際的な研究ネットワーク上でも盛んに議論されている事から、本報告に触発されてNAIPsタンパク質の分子機構やその役割について興味をもつ研究者は多く、NAIPsの機能に関する研究は今後盛んになっていくものと予測される。

病原細菌の感染に伴い誘導されるinflammasome活性化とpyroptosis誘導、及びその結果引き起こされる炎症応答、それらに対するNAIPsの関連性については、その免疫誘導における重要性から世界各地の研究グループ間での研究競争が激化しているが、細胞死という現象特有の複雑さやinflammasome構成因子であるNLRsやNAIPsの解析の難しさから未だ体系的な知識基盤の確立には至っていない。そこで本研究は、非鞭毛性病原細菌の代表として赤痢菌感染モデルを用い、菌体由来成分がinflammasomeに認識される機構の解明を目的とした研究を行った。具体的には、まずinflammasomeを活性化する菌体由来分子の特定を行った。またNAIPsファミリータンパク質に着目し、inflammasome活性化機構に対するNAIPsファミリータンパク質の関連性を検証した。

## 2. 方法

### 1, inflammasome を活性化する細菌由来リガンドの特定

赤痢菌やサルモネラ菌が誘導する inflammasome の活性化は、T3SS 依存的であることがわかっている。そこで、T3SS エフェクターに焦点をあて、inflammasome を活性化する細菌分子の探索を行った。所属研究室では一連の赤痢菌 T3SS effector の deletion mutant ライブラリーを有しており、これ

らの菌株を用いてマクロファージに対する *in vitro* 感染実験を行う事により、inflammasome 活性化に影響がある T3SS effector のスクリーニングを試みた。また、この検証方法では T3SS を構成する構造タンパク質の検証が不可能であることから、T3SS 構造タンパク質に対しては一連の条件検討の結果最も効果的であったレトロウイルスベクターを用いたマクロファージ発現系を用いて赤痢菌由来のトリガー分子の特定を行った。inflammasome の活性化の強さを判断する指標として、IL-1 $\beta$  ELISA 解析及び Caspase-1 P20 (活性型) のウエスタン解析を行った。

## 2, 赤痢菌由来分子により活性化される inflammasome pathway の特定

NLRP3, NLRC4, ASC 等のノックアウトマウスより骨髄マクロファージを分離誘導し、リガンドがどの NLR inflammasome 経路を活性化させているのか特定した。同時に NLRP3, NLRC4, ASC の siRNA/shRNA ノックダウン解析を行った。

## 3, NAIP 経路の特定

各種 NAIPs の shRNA/siRNA ノックダウン解析により、リガンドがどの NAIP 経路で inflammasome を活性化させるのかを特定した。また、各種 NAIPs をノックダウンしたマクロファージ細胞のイムノヒスト解析及び架橋剤処理後のウエスタン解析を行い、細胞における ASC pyroptosome 形成がどのような影響を受けるか確認した。

## 4, 細菌リガンドと NAIPs 間の結合特異性の検証

GSTプルダウンアッセイ、免疫沈降の手段を用いて、特定した赤痢菌由来分子と各NAIPs及びNLRC4間のタンパク質レベルでの結合能を検証した。

# 3. 結果 研究成果

## 1, 赤痢菌 T3SS の inner rod protein ; MxiI が、NLRC4 inflammasome を活性化する

MSCV2.2-IRES-GFP レトロウイルスベクターにトリガー候補遺伝子をクローニングし、immortalization 処理を行ったマクロファージに発現させることにより赤痢菌由来のトリガー分子探索を行った。その結果、T3SS の inner rod protein である MxiI が、NLRC4 inflammasome を活性化しマクロファージに pyroptosis を引き起こすことを見出した。

## 2, 赤痢菌は NLRC4 依存的に inflammasome を活性化する

過去の知見によると、赤痢菌の感染に際し NLRC4-dependent な inflammasome 活性化がおこることが示唆されている。そこで本説を検証するために BL6 バックグラウンドの NLRP3, NLRC4, ASC ノックアウトマウスより骨髄マクロファージを分離誘導し、赤痢菌感染がどの inflammasome 経路を活性化させているのか特定した。その結果、本研究においても BL6 バックグラウンドでは NLRC4-dependent 且つ NLRP3-independent な inflammasome 活性化が赤痢菌感染により引き起こされることが裏付けられた。NLRP3 及び NLRC4 の siRNA/shRNA ノックダウン解析の結果においても同様な傾向が認められた。また、マクロファージ細胞内における MxiI タンパク質の発現のみでも NLRC4-dependent な inflammasome の活性化が認められた。

## 3, 赤痢菌は NAIP2 依存的に NLRC4 inflammasome を活性化する

各NAIPファミリータンパク質のshRNA/siRNAノックダウン解析の結果、赤痢菌感染による inflammasome 活性化は、NAIP2-dependent であることがわかった。一方、フラジェリン応答に重要であると言われている NAIP5 は赤痢菌感染においては特に影響が認められなかった。inflammasome 活性化時には、マクロファージ細胞において ASC の高次凝集体構造 (ASC pyroptosome) の形成が認められることが報告されているため、本研究では NAIPs をノックダウンした赤痢菌感染マクロファージにおける ASC の挙動をイムノヒストイメージング解析により検証した。その結果、NAIP2 ノックダウン細胞では ASC pyroptosome 形成が有為に遅延することが確認された。一方、NAIP5 ノックダウン細胞では、その影響は認められなかった。同様の目的のために、更に各種 NAIPs ノックダウン細胞に赤痢菌感染後、DSS 架橋剤処理を行いウエスタン解析することにより、感染細胞における ASC 重合体形成を検証した。その結果、イムノヒストイメージング解析同様、NAIP2 ノックダウン細胞では ASC 重合体構造の形成が有為に遅延することが確認された一方、NAIP5 では影響が認められなかった。また、サルモネラ感染においては inflammasome の活性化には PKC  $\delta$  による NLRC4 のリン酸化が必須であるという論文が 2012 年に報告されたが、本研究においては赤痢菌感染による inflammasome 活性化に PKC  $\delta$  依存性は認められなかった。

#### 4. 赤痢菌の MxiI は NAIP2 及び NLRC4 と特異的に複合体を形成する

特定した赤痢菌 MxiI、NAIP2、NLRC4間のタンパク質結合能をGSTプルダウン解析及び免疫沈降法により検証した。その結果、これら3者の間において特異的に複合体形成が認められた。また、赤痢菌感染時に、NAIP2とNLRC4との結合能が認められた。

#### 4. 考察 まとめ

本研究において、赤痢菌 T3SS の inner rod protein である MxiI が、NLRC4 に認識され inflammasome 活性化を誘導することを見出した。赤痢菌の MxiI は NAIP2 及び NLRC4 と特異的に複合体を形成し、赤痢菌は NAIP2 依存的に NLRC4 inflammasome を活性化していた。

赤痢菌は宿主免疫機能から逃れるために鞭毛を捨て収斂進化してきた細菌であると考えられている (AI Mamun et al., 1996; Tominaga et al., 2005)。病原細菌にとって鞭毛を持つということは、運動能を獲得できるというメリットと同時に、鞭毛構成成分であるフラジェリンが免疫応答の主要なターゲットであることから強い免疫応答を誘導しやすく大きなリスクを背負うことになる。従って、赤痢菌のように免疫反応を最小限に抑えて感染成立させるために、進化の過程で鞭毛を捨てるという戦略をとる病原細菌が存在する (Oshima et al., 2004; Kakizawa et al., 2006; Suzuki et al., 2006)。一方宿主側としては、逆にこれら非鞭毛性病原細菌の感染に備えた機構を獲得する必要があり、実際にフラジェリンを持たない病原細菌でも認識し免疫応答を起こすためのシステムを獲得している。今回本研究において、赤痢菌 T3SS の構造タンパク質である inner rod protein が NAIP2 による認識を受けている事を明らかにしたわけであるが、inner rod protein は T3SS を持つ病原細菌に広く保存されている 15kDa 程の小さな構造タンパク質であり、Type III エフェクタータンパク質が装置を通り分泌される際に巻き込まれるようにして宿主の細胞質中に漏れだすと考えられている。T3SS が不活性状態では細胞質中への MxiI の放出はおこらず、T3SS 構造の表面に露出していない MxiI が認識を受けることはなく inflammasome の活性はおこらない。しかし、T3SS が ON の状態になると MxiI の細胞質中への放出がおこり NAIP2 による認識及び inflammasome 活性化がおこる、言い換えると病原性がある (T3SS が active である) 状態の病原細菌を特異的に検出することが可能である。従って、NAIP2 が MxiI をターゲットとして認識することは過剰な inflammasome 活性化を回避することを可能にし、高度に regulate された優れたシステムであると考察できる。以上の研究成果は論文にまとめ、PLoS Pathogen にて報告した (Suzuki et al., 2014 PLoS Pathogen)。

また本実験計画を実施する過程において、Type III エフェクターの 1 つである IpaH7.8 が inflammasome を活性化する現象が認められた。解析を進めた結果、IpaH7.8 による inflammasome 活性化は特定の NLR や NAIP に依存しているわけではなく、非特異的に inflammasome 活性を高めていることが確認され、当初の研究計画にて想定していた菌体由来物質-NAIP-NLRC4 経路とは別の作用機序により inflammasome 活性を促進していることが判明した。IpaH7.8 に関する研究は本研究と並行してすすめ、得られた研究成果は、別の論文 (Suzuki et al., 2014 PNAS) にまとめ報告した。

#### 5. 発表論文、参考文献

Shiho Suzuki, Luigi Franchi, Yuan He, Raul Munoz-Planillo, Hitomi Mimuro, Toshihiko Suzuki, Chihiro Sasakawa, Gabriel Nunez (2014) ***Shigella* type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlrc4 inflammasome activation independently of Pkcd.** *PLoS Pathog* 10(2): e1003926.

Shiho Suzuki, Hitomi Mimuro, Minsoo Kim, Michinaga Ogawa, Hiroshi Ashida, Takahito Toyotome, Luigi Franchi, Masato Suzuki, Takahito Sanada, Toshihiko Suzuki, Hiroko Tsutsui, Gabriel Núñez Chihiro Sasakawa (2014) **The *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets Glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(40), E4254-E4263