

病原細菌による宿主免疫反応抑制機構の解明

千葉大学真菌医学研究センター細菌感染免疫プロジェクト

芦田 浩

1. 背景および目的

赤痢菌は細菌性赤痢の起原因菌であり、開発途上国では乳幼児を中心に年間1億人以上が罹患している。現在では抗生剤治療が行われているが、多剤耐性赤痢菌の出現が問題となっており、また未だに有効なワクチンが存在しないことから、新たな治療法・ワクチン開発が望まれている。このためには未だに未解明な点が多い赤痢菌の感染機構の解明は必須である。

生体は病原細菌の感染に対し、生体防御機構を誘導することで感染の拡大を防いでいる。感染初期に菌の侵入を感知、増殖を阻止する自然免疫系の発動は、菌の感染阻止に不可欠である。これに対し、赤痢菌をはじめとする病原細菌はIII型分泌装置と呼ばれるタンパク分泌装置を介して一群の病原因子(エフェクター)を宿主細胞に分泌し、細胞機能を菌にとって有利なものへと修飾する。その結果、宿主による自然免疫応答を抑制し、感染を成立させる。エフェクターによる自然免疫克服は感染持続に不可欠なものであるが、その詳細な機構は明らかとなっていない。

赤痢菌のエフェクターの一つであるIpaHファミリーはE3リガーゼ活性を有し、多くの病原細菌に複数個保存されている。これまでの申請者の研究によりIpaHの一員であるIpaH9.8およびIpaH0722が自身のE3リガーゼ活性により宿主のNEMOおよびTRAF2をユビキチン化、タンパク分解へと導くことでNF- κ B活性化を阻害し、免疫応答を抑制することが明らかとなった。これより他のIpaHも各々特有の標的因子の機能を制御することで自然免疫応答を抑制することが示唆される。そこで本研究では、赤痢菌IpaHファミリーによる自然免疫抑制機構、特にI型インターフェロンによる生体防御機構抑制に焦点を絞り、研究を行った。

2. 方法

2-1 IpaHファミリータンパクの標的シグナル経路の同定

赤痢菌感染に伴い活性化される、各種シグナル伝達経路の下流に位置する転写因子(NF- κ B、AP-1、Erk1/2、IFN- β 等)のレポーターアッセイを用いることにより、各IpaHファミリータンパクの作用するシグナル伝達経路を特定した。さらに、赤痢菌野生株および各*ipah*遺伝子欠損株を感染させた培養細胞において、各種シグナル伝達経路構成因子の発現や活性の比較により各IpaHタンパクの作用点を特定した。具体的には、同定したシグナル経路の各因子のタンパク質発現量、mRNA発現量をウエスタンブロットティングおよびリアルタイムPCR法により定量することで解析を行った。

2-2 IpaHファミリータンパクの宿主標的因子の探索

酵母ツーハイブリッド法、Pull-down assay、免疫共沈降法といったタンパク-タンパク間の相互作用を利用した手法を用いて、各IpaHファミリータンパクの宿主細胞内標的因子を探索した。得られた標的因子候補は、一連のレポーターアッセイにより特定された各IpaHタンパクの標的とするシグナル伝達経路との整合性の検証後、IpaHタンパクとの結合能の確認、また共焦点レーザー顕微鏡を用いた、宿主細胞内共局在確認を行ない、標的タンパクとして同定した。

3. 結果

ウイルスや細菌のもつ DNA や RNA は各種宿主センサーにより認識され、シグナル伝達経路の活性化を通じ、I 型インターフェロンである IFN- α , - β 産生を誘導し、生体防御機構において重要な役割を担う。病原細菌より遊離された二本鎖 DNA の場合は DNA センサーに認識され、アダプター分子である STING と結合し、下流のリン酸化酵素である TBK1、IKKi の活性化を促す。活性化された TBK1-IKKi 複合体は転写因子である IRF3 のリン酸化を誘導し、その後核内へと移行し、転写反応を開始させる。

赤痢菌感染における I 型インターフェロン産生誘導機構を確認したところ、赤痢菌感染時には RNA センサーは関与せず、STING による DNA 認識経路が関与していることが確認された。さらにこの I 型インターフェロン産生は赤痢菌の細胞内生存を抑制したことから、赤痢菌に対する自然免疫応答として重要であることが明らかとなった。

続いて、赤痢菌 IpaH ファミリータンパクの中には宿主自然免疫応答を抑制する機能を有するものが存在することから、I 型インターフェロン経路に関与するものがあるかを確認した。複数のアッセイの結果、IpaH タンパクのうち、IpaH5 が感染に伴う IFN- β 活性を有意に抑制することが示された。赤痢菌野生株および *ipah5* 欠損株を培養細胞に感染させ、IFN- β mRNA 発現量を測定した。この結果、*ipah5* 欠損株感染時に野生株感染時よりも高い IFN- β mRNA 発現量を示した。また、赤痢菌野生株、*ipah5* 欠損株、IpaH5 補填株および *ipah5* E3 リガーゼ活性変異体の補填株を用いて赤痢菌感染細胞における転写因子 IRF3 リン酸化量を比較したところ、野生株および *ipah5* 補填株感染時に比べ、*ipah5* 遺伝子欠損株および *ipah5* E3 リガーゼ活性変異体補填株感染時に IRF3 リン酸化量が増加していることが示された。

次に IpaH5 が I 型インターフェロンシグナルのどの因子を標的にするのかを明らかにするため、各種シグナル分子を用いた免疫沈降によるタンパク結合確認の結果、IpaH5 はそのシグナル分子である X との結合が確認された。IpaH5 は E3 リガーゼ活性依存的に I 型インターフェロンを抑制することから、続いて、この結合の確認された X が IpaH5 E3 リガーゼの基質となるかを確認した。この結果、IpaH5 存在下では X のユビキチン化が確認されたが、IpaH5 E3 リガーゼ変異体存在下においては確認されなかった。さらに IpaH5 によりユビキチン化された X はタンパク分解されることから、IpaH5 は X と結合し、ユビキチン化、タンパク分解へと導くことで I 型インターフェロン産生を抑制することが示された。

4. まとめ

本研究では病原細菌である赤痢菌による新たな宿主自然免疫克服戦略を解明した。赤痢菌感染に対して I 型インターフェロン産生による自然免疫応答が誘導されるが、これに対し IpaH5 がそのシグナル因子である X を標的とし、ユビキチン化、タンパク分解へと導くことで I 型インターフェロン産生を抑制することを明らかにした。本研究により得られた成果は、未だ安全なワクチンが開発されていない赤痢菌において、有効なワクチン開発の基盤と成る可能性を有するとともに、その機能を模倣した炎症抑制剤への創薬開発が期待される。

5. 発表論文

- 1) **Ashida H** & Sasakawa C. Bacterial E3 ligase effectors exploit host ubiquitin systems. *Curr. Opin. in Microbiol.* in press.
- 2) **Ashida H** & Sasakawa C. *Shigella* IpaH family effectors as a versatile model for studying pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5. 100 (2016).