

# 腸管細菌がハイジャックする宿主免疫応答

京都大学・白眉センター

KIM Minsoo (金 玫 秀)

## 1. はじめに

### 目的

多くの抗生物質を手にした現代においても、細菌感染症は人類にとって大きな脅威である。病原性大腸菌を含む腸管病原細菌は近年、多剤耐性菌による感染症例が増加し、有効なワクチンもいまだ開発されていないため、新たな治療薬の開発が喫緊の課題である。申請者はこれまでに腸管病原細菌による感染症において、ユビキチン・プロテアソーム系による蛋白質分解が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。

本研究では、宿主のユビキチン・プロテアソーム系をハイジャックすることにより、獲得免疫系を回避する病原細菌の戦略を解明し、その知見に基づき、新たな感染症治療薬の開発基盤を築くことを目的とする。

### 背景

蛋白質分解機構の1つであるユビキチン・プロテアソームシステムは細胞周期制御や発生・発癌・神経変性疾患など様々な生命現象に関わっている。蛋白質分解はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン連結酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の連鎖的な酵素反応により、基質蛋白質にユビキチンが付加される。ユビキチン化された蛋白質の多くはプロテアソームによって認識され、分解される。近年、様々な病原細菌の蛋白質 (=病原因子) の中に、宿主細胞のユビキチン分解経路を制御し、感染成立に必要な細胞応答を引き起こすものが存在することが報告されている。

赤痢菌の病原因子の1つである IpaH ファミリー蛋白質は、赤痢菌やサルモネラなど他の病原細菌に広く存在する。IpaH ファミリーはその構造上、N 末端側にロイシンリッチリピート、C 末端側にファミリー内で相同性の高い領域を有し、ユビキチンリガーゼ活性を持つ。ユビキチンリガーゼは基質蛋白質を認識してユビキチン化する酵素であり、ユビキチン化を介した蛋白質分解システムにおいて、標的基質を決定する役割を担っている。IpaH は構造解析結果から HECT型や RING 型といった哺乳類のユビキチンリガーゼとは異なる新しいタイプのリガーゼ (Novel E3 Ligase: NEL 型)であることが明らかになった。我々をはじめとする研究報告から、IpaH ファミリーは、赤痢菌の感染において誘導される宿主側の免疫応答を抑制し、感染成立を担う重要な病原因子であると考えられる (Kim et al., *Cells*, 3(3), 848-864, 2014.)。申請者らは、病原細菌が持つユビキチンリガーゼの研究を行い、赤痢菌のユビキチンリガーゼである IpaH4.5 がプロテアソームの構成因子である RPN13 と結合することを見いだした。RPN13 はユビキチン受容体でプロテアソーム構成の必須因子である。本研究では、宿主のユビキチン・プロテアソーム系をハイジャックし、感染を成立させるメカニズムについて解明を行った。

## 2. 方法

### In vitro ubiquitination assay

E1 (3ng/ul)、大腸菌より精製した E2(Ubc5A)、V5-IpaH4.5 (野生型または C379A) 及び HIS-Rpn13 をユビキチン化バッファー [20mM Tris (pH8.0)、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、150mM NaCl、2mM ATP、0.8ng/ul ubiquitin (Sigma)] に混合し、30°Cで 90分間反応させた。SDS-PAGE にて展開後、ウエスタンブロットにより解析した。ユビキチン化された蛋白質は、適当な抗体を用いて検出した。

### RNA 干渉

*Rpn13* の発現を抑制するための短鎖干渉 RNA (short interfering RNA, siRNA) を設計した。Invitrogen 社のマニュアルに従い、HCT116 細胞に RNAi MAX (Invitrogen) を用いて siRNA オリゴを導入し、72 時間後に細胞可溶化液を調整した。

### 定量 PCR

細胞から RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を単離精製し、SuperScript® III First-Strand kit (QIAGEN) による逆転写反応で一本鎖 cDNA を得た。これを鋳型として、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量PCR を行った。内在性コントロールとして hypoxamine guanine phosphoriboxyl transferase (HPRT) を用い、ノーマライズした。統計処理は Prism6 ソフトにより行った。

### 赤痢菌感染実験

赤痢菌の野性株および変異株は Muller Hinton 液体培地で 30°C、一晚振盪培養した。この前培養液 100µl を 5ml の BHI 液体培地に接種し、37°Cで 2時間振盪培養した。培養液を室温で遠心、沈降させた菌体を適量の培地に懸濁し細胞に添加した。室温にて 700g で 10 分間遠心し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で 15 分静置後、培養液を ゲンタマイシンとカナマイシン を含む培地に交換した。さらに、適当な時間 37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

## プロテアソーム活性測定

調整した細胞可溶化液を8-32% (vol/vol) グリセロール密度勾配遠心法(22 h, 83,000 × g)で分離した。グリセロール密度勾配法によって分画した各分画を、キモトリプシン様活性をもつプロテアーゼの基質として Suc-LLVY-AMC を反応させ、蛍光量を測定し、定量的に活性を評価した。

### 2-7) フローサイトメトリー解析

赤痢菌の野生株または欠損株などを感染させて BMDM 細胞を CD11b and MHC class I/OVA に対する蛍光抗体で 30 分間染色し、MACS Quant VYB (Miltenyi Biotec) より解析した。FACS データは FlowJo を用いて解析した。IL2 の産生量は ELISA 法で測定した。

## 3. 結果

### <項目 1：赤痢菌によるプロテアソームの活性制御メカニズム>

申請者は IpaH4.5 の基質分子として、プロテアソームサブユニットである RPN13 を同定した。IpaH4.5 が RPN13 をどのように制御するか調べるため、以下の実験を行った。

#### (1) 赤痢菌感染における RPN13 の蛋白量の変動解析

赤痢菌野生株または IpaH4.5 欠損株を用いて、ヒト結腸腺癌由来の HCT116 細胞に感染させ、Rpn13 の蛋白質の量の変動を 2 時間モニタリングした。その結果、野生株を感染させた細胞では Rpn13 の分解が確認できたが、IpaH4.5 欠損株を感染させた細胞では Rpn13 の分解は認められなかった。次に、Rpn13 の分解がユビキチン化によるものかを次に調べた。E1, E2, E3 (IpaH4.5), Rpn13, Ubiquitin を精製し、in vitro ubiquitination assay を行った。その結果、IpaH4.5 依存的に Rpn13 のユビキチン化が見られた。IpaH4.5 は Rpn13 をユビキチン化することにより、Rpn13 を分解すると考えられた。

しかし、120 分以上感染させた細胞では RPN13 の蛋白質は再び上昇してくるのを見いだした。この上昇が、mRNA レベルでの発現制御なのかを調べるために、赤痢菌感染後の HCT116 細胞を使って、Real-Time PCR により RPN13 mRNA の発現量を定量的に調べた。その結果、赤痢菌感染において、経時的に RPN13 mRNA の発現量が徐々に上昇した。ユビキチン・プロテアソーム系はさまざまな外来からの刺激、ストレスにより転写が上昇することが知られている。これらの結果により、赤痢菌感染細胞では、IpaH4.5 による RPN13 の分解を受け、感染防御として Rpn13 の転写制御を発動していると考えられる。

### <項目 2：病原細菌によるプロテアソーム活性制御機構とその意義の解明>

#### (2) 赤痢菌感染における Rpn13 の分解がプロテアソームの活性にどのような影響を及ぼすかを調べた。

HCT116 細胞に、赤痢菌の野生株及び IpaH4.5 の欠損株を感染させ、細胞の抽出液を調整し、グリセロール密度勾配法によってプロテアソームを精製した。精製プロテアソームの活性を測定すると共に、各プロテアソーム構成因子の抗体を用いたウェスタンブロットにより、プロテアソームの構成に影響があるかを調べた。その結果、野生株感染細胞では IpaH4.5 欠損株を感染させた細胞よりプロテアソームの活性の減弱が見られた。Rpn13 は IpaH4.5 依存的に分解されていたが、他のプロテアソーム構成因子の蛋白量の変動およびプロテアソームの構成には影響が見られなかった。さらに、siRNA 法を用いて、Rpn13 をノックダウンした細胞を用いた場合も同様な結果が得られた。さらに、プロテアソーム活性低下による宿主細胞内の蛋白質群の分解異常を調べた。赤痢菌の野生株及び IpaH4.5 の欠損株を感染させた細胞から抗ユビキチン抗体を用いて、ユビキチン化修飾を受けた蛋白質の量を調べた。野生株感染細胞ではユビキチン化蛋白質の蓄積が認められたが、IpaH4.5 の欠損株感染細胞では蓄積は認められなかった。以上のことより、Rpn13 の蛋白質の分解はプロテアソームの活性を減弱させ、宿主細胞の蛋白質分解システムを攪乱すると考えられる。

### <項目 3：病原細菌による獲得免疫の回避メカニズムの解明>

細菌やウイルス感染時、MHC クラス I によって提示される抗原ペプチドの産生にプロテアソームは重要な役割をする (*Nat Rev Immunol*, 11, 823)。感染時、宿主細胞内では細菌やウイルスの蛋白質をプロテアソームにより分解し、その後、ペプチターゼなどにより 7-8 アミノ酸に分解し、MHC class I と結合する。外来抗原ペプチド-MHC class I 複合体は細胞膜へと輸送され、細胞障害性 T 細胞に抗原提示を行い、活性化する。この障害性 T 細胞の活性化が宿主の感染防御に重要である。

(3) IpaH4.5 が赤痢菌感染において、MHC クラス I による抗原提示を抑制しているかを検討した。しかし、赤痢菌においては MHC クラス I によって提示される抗原が未同定ゆえ、感染における抗原提示能及び細胞障害性 T 細胞の活性化能を評価する新たな系を立ち上げた。簡単に、既知の抗原 (OVA) を発現する赤痢菌株 (野生株-OVA) を作製し、OVA 発現赤痢菌を細胞に感染させた時の抗原提示能や細胞障害性 T 細胞の活性化能を、MHC クラス I-OVA 複合体に対する抗体等を用いた FACS 解析により評価する系を構築した。この評価系を用いて、IpaH4.5 欠損株-OVA を作製し、野生株-OVA と比較し、抗原提示能や細胞障害性 T 細胞の活性化能を調べた。その結果、IpaH4.5 欠損株-OVA を感染した細胞と比べ、野生株-OVA を感染させた細胞では MHC クラス I による抗原提示を抑制されていた。細胞障害性 T 細胞の活性化も低下しており、T 細胞の増殖を示す IL2 産生量も抑制されていた。

- (4) 感染個体で細胞障害性 T 細胞の活性化を調べた。野生株また IpaH4.5 欠損株をマウスに経鼻感染を行い、感染した肺組織から免疫細胞を単離し、CD4+または CD8+ T 細胞を調べた。その結果、両方とも、CD4+ T 細胞には差が認められなかった。しかし、IpaH4.5 欠損株を感染させたマウスに比べ、野生株を感染させたマウスでは CD8+ T 細胞が顕著に減少していた。

以上の結果から、IpaH4.5 は RPN13 を分解し、プロテアソームの活性化を抑制する。その結果、感染細胞での抗原提示能が低下され、獲得免疫から回避されると考えられる。

本研究では、赤痢菌感染において、(1)プロテアソーム制御メカニズムの解明、(2) 抗原提示能を抑制し、獲得免疫制御することによって、感染を成立させるという赤痢菌の感染戦略を明らかにした。

#### 4. 考察

プロテアソームはユビキチン化した蛋白質を選択的に分解する巨大な蛋白質の複合体であり、MHCクラスIによって提示される抗原ペプチドの産生に重要な役割をしている。CD8依存的なMHCクラスIの制御は、ウイルス感染防御ではよく利用される獲得免疫システムであるが、病原細菌の感染症に対してはその例がほとんどない。しかし、申請者らは赤痢菌感染細胞において、赤痢菌の病原因子依存的に、①プロテアソームの活性が低下していること、②その結果、抗原提示能が低下して、T細胞の活性化を抑制していることを発見した。これらの知見は、病原細菌に対しても獲得免疫システムが発動し、他方、病原細菌はその獲得免疫システムを抑制する感染戦略を持つことを示唆しており、新たな感染制御機構の解明につながると考えられる

#### 5. 発表論文

- 「病原細菌による宿主粘膜感染の分子機構の解明」 金玟秀  
Journal of the Society of Japanese Women Scientists, Vol.17, 1-11, 2017 (in press)