

赤痢菌の腸粘膜バリアー感染戦略の解明

Study of *Shigella* infectious strategy for the intestinal Barrier

笹川 千尋 (SASAKAWA CHIHIRO)

東京大学・医科学研究所・教授



研究の概要

腸管粘膜には粘膜固有バリアと感染に応答して起動する自然免疫バリアが構築され、病原体の侵入を阻止している。本研究では赤痢菌が保有する III 型分泌装置より宿主へ分泌されるエフェクターに注目して、感染に果たすエフェクターの役割の解明を通じて粘膜バリアに対する菌の普遍のおよび特異的な感染戦略を明らかにする。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

病原細菌は粘膜上皮細胞を足場として感染しさまざまな疾患を引き起こす。赤痢菌をはじめとする粘膜病原細菌は、III 型分泌装置 (T3SS) を通じてエフェクターと呼ばれる一群の病原因子を宿主細胞へ分泌し、感染に必要な細胞機能を宿主から収奪する。一方、宿主の粘膜上皮は、固有バリアと自然免疫バリアを主体とする多様な生体防御機構を備え微生物の侵入を阻止する。しかし、赤痢菌をはじめとする粘膜病原細菌は、これらバリアを巧みに回避して感染する。病原菌の粘膜感染では菌と宿主から多数の因子が動員され、それらの感染とその成立における病原体と宿主の相互作用は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、T3SS から分泌される一群のエフェクターに着目し、赤痢菌の固有バリアと自然免疫バリアの克服に関わるエフェクターとその標的因子を同定し、それら細胞内機能を、分子、細胞、組織、個体の各レベルで精査する。感染の各過程におけるこれらエフェクターと宿主標的因子との相互作用を時空列的に解析するとともに、他の粘膜病原細菌の類似なエフェクターとも比較解析し、これら知見を統合して、粘膜病原細菌の新たな感染現象と腸粘膜バリアに対する普遍のおよび特異的な感染戦略を明らかにする。

3. 研究の方法

赤痢菌は感染において T3SS を通じて 60 種以上のエフェクターを分泌することが示唆されている。これまでに十数種のエフェクター機能が報告されたが、依然として多くのエフェクターの細胞内機能と感染における役割は不明である。そこで、本研究では、赤痢菌が上皮細胞内で分泌する新規エフェクターをプロテオミクスにより網羅的に同定し、その個々の細胞内動態および感染における役割を、一分子イメージ、細胞生物学、免疫学、病理組織学、実験動物学的手法を動員して精査するとともに、菌が細胞内へ適応するための新規な戦略とそれに対する宿主防御システムを以下に述べる研究計画に沿って解明する。また我々が同時並行して行っているピロリ菌、EPEC、リステリア・モノシトゲネスの感染システムの研究結果とも相互に比較して、これらの知見を総合して病原細菌の粘膜バリア感染におけるに普遍のおよび個別的な感染戦略を統合的に理解する。

4. これまでの成果

上皮バリアー感染戦略の解明

腸上皮細胞は感染に反応して細胞を基底膜より剥離・除去する。これに拮抗して赤痢菌は、OspE エフェクターを分泌しインテグリンリンクトキナーゼ (ILK) に結合して細胞接着を強化して感染上皮細胞の剥離を積極的に阻止する戦術を保持していることを明らかにした。本研究は、粘膜上皮に普遍的に存在する損傷細胞の除去システムが、粘膜固有

バリアとして機能していることをはじめに証明するとともに、病原体の除去システムとして細胞剥離が生体防御に極めて重要な役割を担っていることを示した。また、赤痢菌を始めとするサルモネラや 0157 等の腸管系病原細菌は、OspE ファミリーエフェクターを分泌し、細胞剥離に対抗するための高度に進化したシステムを備えていることをはじめに示した。

細胞間バリアー克服戦略の解明

赤痢菌は細胞間接着により形成される 2 重の細胞質膜を突破する。この 2 重膜の突破（菌の隣接細胞への拡散）は、(i)アクチン重合により運動する菌の形質膜への接触、(ii)形質膜に取り囲まれた菌による突起の形成、(iii)突起の隣接細胞への挿入、(iv)隣接細胞による菌を包む突起のエンドサイトーシス、(v)菌を包む 2 重膜のピンチオフ、(vi)菌による 2 重膜の破壊と細胞質への離脱、の一連の過程により行われていることが示唆された。本研究ではさらに、(i)赤痢菌の細胞間拡散において multicellular tight junction (MC)J が拡散の主要ルートとして利用される、(ii)赤痢菌の細胞間拡散では、上述の(iii)のステップにおいて非典型的なクラスリン依存的な細胞間輸送機構が関与していることを以下の実験により明らかにした（論文投稿中）。

免疫バリアー回避戦略の解明

(i) IpaH9.8 による炎症抑制：IpaH9.8 の標的宿主因子として、IKK 複合体の中心的な制御因子である NEMO およびそのユビキチン化を制御する ABIN1 を同定した。IpaH9.8 は、ABIN1 との結合依存的、および自身の E3 リガーゼ活性依存的に NEMO に対して非典型的なユビキチン化を引起し（ユビキチンリジン残基 27 依存的）、その結果としてプロテアソーム依存的な分解を受けて IKK の活性化が失われ NF- κ B の活性化が抑制されることを明らかにした。さらに、マウス経鼻感染による肺炎惹起モデルにより、赤痢菌の定着率は、IpaH9.8 の E3 リガーゼ活性依存的に促進することが示され、IpaH9.8 による炎症抑制は菌の感染を促進するために重要であることが明らかとなった。

本研究では、病原細菌の E3 ユビキチンリガーゼの基質をはじめに同定するとともに、その酵素作用、およびその炎症シグナル抑制の分子機構を世界に先駆けてはじめて報告した（Nat Cell Biol 2010、Cur Opin Immunol 2011）。

(ii) オートファジー：リステリアのオートファジー回避機構の解析を行い、菌の表面に発現してアクチン重合を誘導する ActA が、オートファジーによる認識を回避するために中心的な役割を果たしていることを示した。ActA は宿主細胞内で VASP、Arp2/3 複合体、F-アクチン等と結合する結果、それら宿主タンパク因子が菌体の表面に沈着することにより、オートファジーによる異物認識が攪乱されることを証明した。本研究により、赤痢菌

(Science 2005) とリステリアの各々特徴的なオートファジー回避のメカニズムを明らかにすることができた。

5. 今後の計画

本研究により、赤痢菌による粘膜バリアに対する突破戦略の一端が解明され、それに関連する新たな病原因子、感染現象、および基本的な粘膜固有の防御システムが明らかにされた。しかし、赤痢菌にはまた多くの機能未知のエフェクターが T3SS を通じて宿主粘膜へ分泌されている。したがって、今後は赤痢菌の新規なエフェクターの機能解析をさらに進め、特に自然免疫の克服に対する菌の基本戦術を解明する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

1. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Suzuki S, Sanada T, Punginelli C, Mimuro H, Sasakawa C. *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. *Curr Opin Microbiol*. 14, 16-23 (2011)
2. Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C. Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe*. 8, 20-35 (2010)
3. Ashida H, Kim M, Schmidt-Supprian M, Ma A, Ogawa M, Sasakawa C. A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKK γ to dampen the host NF- κ B-mediated inflammatory response. *Nat Cell Biol*. 12, 66-73 (2010)
4. Ashida H, Ogawa M, Mimuro H, Sasakawa C. *Shigella* infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system. *Curr Top Microbiol Immunol*. 337, 231-55 (2009)
5. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, Mimuro H, Nakagawa I, Yanagawa T, Ishii T, Kakizuka A, Sztul E, Chakraborty T, Sasakawa C. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol*. 11, 1233-40 (2009)
6. Kim M, Ogawa M, Fujita Y, Yoshikawa Y, Nagai T, Koyama T, Nagai S, Lange A, Fässler R, Sasakawa C. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature*. 459, 578-82 (2009)
7. Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M, Ishijima N, Morikawa H, Nagai S, Koyasu S, Gilman RH, Kersulyte D, Berg DE, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe*. 5, 23-34 (2009)

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/bac/hp/mainpage.html>