

論文の内容の要旨

論文題目

赤痢菌の病原エフェクターOspC3による Caspase-4依存的細胞死抑制機構の解析

氏名 小林 泰良

赤痢菌 (*Shigella flexneri*) は細菌性赤痢の起因菌であり、経口的にヒトに取り込まれた後、腸管上皮細胞に侵入し、細胞内運動、増殖を行うことで感染を成立させる。その各過程が滞りなく遂行されるためには、病原性プラスミド上にコードされた病原タンパク質である「エフェクター」が重要な役割を担う。エフェクターはグラム陰性病原細菌特有の III 型分泌機構依存的に分泌され、宿主細胞内のタンパク質の機能を調節・修飾または阻害することで菌の細胞内侵入や細胞内運動等の感染現象を積極的に誘導する。これらのエフェクターによる菌の感染戦略の一つに、上皮細胞における感染の足場確保 (図 1) という概念がある。

赤痢菌や他の病原細菌の研究から、「足場確保」には①腸管上皮のターンオーバー抑制、②感染細胞の細胞接着の増強、③感染細胞の細胞死抑制等が考えられている。赤痢菌感染においては、具体的に、腸管上皮のターンオーバー抑制には IpaB、感染細胞の細胞接着の増強には OspE というエフェクターが関与することが報告されているが、感染細胞の細胞死抑制に関与するエフェクターの報告は現在までにない。このよ

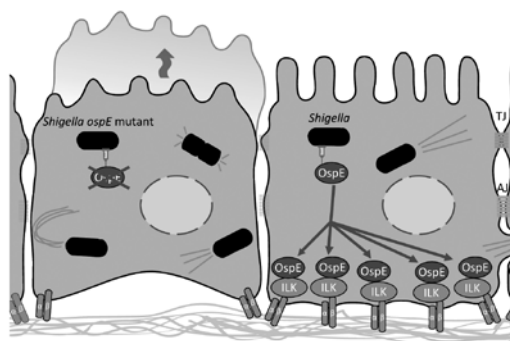


図1 赤痢菌による感染の足場確保戦略

うな状況を鑑みて、赤痢菌における細胞死抑制エフェクターの同定を行い、その作用機序を細菌学・細胞生物学・分子生物学的手法を駆使して明らかにすることを本研究の目的とした。

本研究では、赤痢菌のエフェクターである OspC3 が、宿主カスパーゼ (caspase) 4 の活性を直接抑制することで、感染細胞に惹起されるパイロプトーシス (pyroptosis) 型細胞死を抑制することを解明した。本研究はカスパーゼを直接阻害するエフェクターを初めて同定するとともに、カスパーゼ4依存的パイロプトーシスの分子機序と意義の解明に寄与するものである。

1、OspC3 は赤痢菌感染依存的に生じる細胞死を抑制し、菌の細胞への定着に寄与する

赤痢菌のエフェクター遺伝子が欠損した株を、各々細胞に感染させ、その表現型を解析した結果、OspC3 エフェクター欠損株 ($\Delta ospC3$) が感染した細胞では、赤痢菌の感染としては非常に短時間 (感染後 2-4 時間) で著しい細胞死の惹起が観察された (図2)。さらに感染細胞を経時的に観察した結果、細胞膜の消失および核の収縮が観察された。また動物実験に $\Delta ospC3$ を供した結果、腸管上皮組織への著しい破壊と出血が確認された。これらの感染細胞・組織中の赤痢菌数を測定すると、著しい減少が見られたことから、OspC3 は感染細胞の細胞死を抑制することで感染の足場を確保し、赤痢菌の感染を有利に進める役割があることが考えられた。

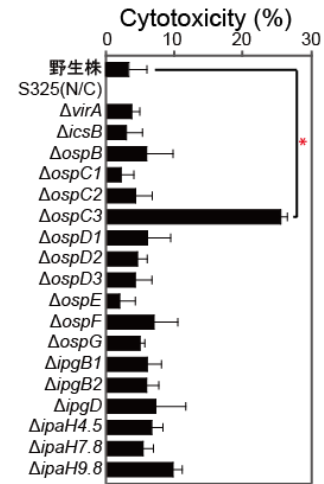


図2 細胞死のスクリーニング
各々の欠損株の感染細胞 (感染後2時間) の上清をLDH assayに供し、細胞死が上昇する欠損株を同定した。* $P < 0.05$

2、OspC3 はパイロプトシス型の細胞死を抑制する

次にOspC3の作用機序を解析するため、細胞死の種類の特特定を行った。現在までに報告されている感染により惹起される細胞死にはネクローシス、アポトーシス、パイロプトシスがある (下表)。

細胞死	ネクローシス	アポトーシス	パイロプトシス	$\Delta ospC3$ 感染
DNA 断片化	×	○	○	○
膜の破綻	○	×	○	○
炎症性サイトカイン	×	×	活性化	活性化
カスパーゼ	非依存的	2?, 3, 6, 7, 8, 9, 10?	1,4	1?, 4?, 5?

$\Delta ospC3$ の感染細胞では、核の断片化 (TUNEL positive) および膜の破綻 (PI positive) を伴う細胞死を生じ、炎症性サイトカイン (IL-18) の活性化・分泌がみられた。またこの感染細胞の細胞死は、カスパーゼ1 / 4 / 5 阻害剤で抑制され、パイロプトシスと呼ばれる細胞死の特徴がみられた。現在までにパイロプトシスは血球系細胞で研究され、カスパーゼ1 依存的なシグナル (インフラマソーム経由) が報告されているが、上皮細胞におけるパイロプトシスの解析は進んでいない。

3、OspC3 はカスパーゼ4を標的とし、赤痢菌感染で生じるカスパーゼ4 依存的細胞死を抑制する

OspC3 の標的因子を同定するために、今までカスパーゼ1のシグナルとして報告のあるタンパク質と OspC3 との結合実験を行ったが、標的は発見できなかった。一方でカスパーゼ1 / 4 / 5 阻害剤で細胞死が阻害された結果から、カスパーゼ1 同様に炎症性カスパーゼに属するカスパーゼ4 / 5 についても結合を確認したところカスパーゼ4との特異的な結合が確認された (図3)。

一般的にカスパーゼは前駆体が限定分解を受け、大サブユニットと小サブユニットによる多量体が形成されることで活性化する。そこで赤痢菌感染細胞中の前駆体の量を、カスパーゼ4抗体を用いたウェスタンブロッティングにより観察した結果、野生株および $\Delta ospC3$ の感染細胞では同様にカスパーゼ4の活性化 (前駆体の消失) が生じていることが確認された。従って、OspC3 はカスパーゼ4の上流からのシグナルを抑制するのではなく、活性化したカスパーゼ4に作用していることが考えられた。

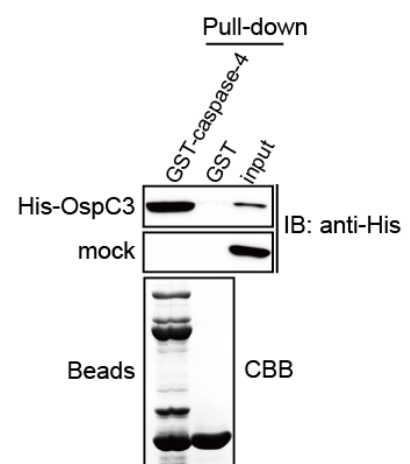


図3 カスパーゼとOspC3の結合
大腸菌から精製したカスパーゼ4のGST結合ビーズを用いて、同じく大腸菌から精製したHis-OspC3との結合をプルダウンアッセイにより確認した。

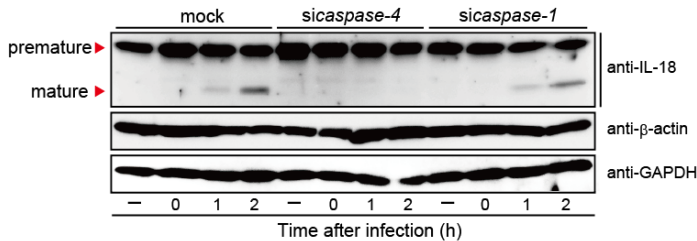


図4、カスパーゼ1/4のノックダウン細胞におけるIL-18の活性化
カスパーゼ1もしくは4をノックダウンした細胞にΔospC3を感染し、細胞溶解物をIL-18抗体によるウェスタンブロットに供した。
* IL-18等の炎症性サイトカインはカスパーゼによる切断を受けることで活性化、細胞外に分泌される。

赤痢菌の感染が誘導するカスパーゼ4依存性なパイロプトシスは、カスパーゼ1に非依存性であることが示された。

今までの多くの報告では、パイロプトシスはカスパーゼ1に依存して生じる細胞死であると報告されている。そこで本細胞死がカスパーゼ1に依存するかどうかを確認するため、カスパーゼ1および4のノックダウン細胞における赤痢菌感染依存性な細胞死を検証した結果、カスパーゼ4のノックダウン細胞でのみパイロプトシスの減少が見られ(図4)、

4、OspC3はカスパーゼ4の大サブユニットに特異的に結合し、プロテアーゼ活性を阻害する

OspC3のカスパーゼ4に対する活性を調べるため、精製タンパク質を用いて阻害効果を確認したところ、精製OspC3は活性化カスパーゼ4(p19とp10からなる4量体)に対して特異的に阻害することが確認された(図5)。プルダウンアッセイの結果、OspC3はカスパーゼ4の大サブユニット(p19)と特異的に結合し、さらにp10のGST結合ビーズを用いたp19およびOspC3のプルダウンアッセイの結果、OspC3の濃度依存的にp19の結合は阻害された。従って、OspC3は、活性化カスパーゼの形成、すなわち4量体化を阻害することが考えられた。

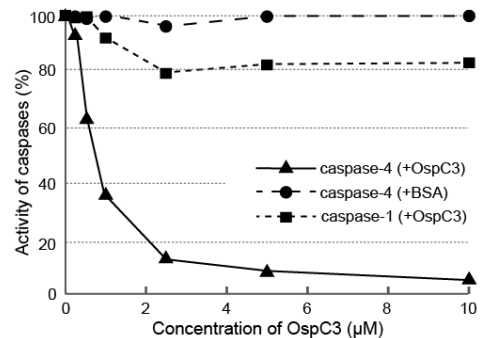


図5、OspC3は活性化型カスパーゼ4を抑制
精製された活性化型カスパーゼに蛍光プローブおよびOspC3を添加し、60分後の蛍光量を測定し、プロテアーゼ活性への阻害効果を調べた。

5、OspC3のカスパーゼ4阻害能にはC末端のアンキリンリピート構造および基質ポケットに侵入するLSTDN配列が必須である

OspC3のカスパーゼ4に対する機能ドメインを同定するため、OspC3の部分欠損変異体とカスパーゼ4の結合をプルダウンアッセイによって確認した結果、C末端約30アミノ酸領域(451-484AA)が結合に必須であることが示唆された。この配列を相同性解析により他の菌由来タンパク質と比較した結果、一部の偏性細胞内寄生細菌および天然痘ウイルスが保持する機能未知タンパク質のアンキリンリピートとの相同性が認められた(図6)。そこでアンキリンリピート構造を変化させるために、保存されている3アミノ酸LALをAGAに変異したOspC3-ΔAnkの結合を検討した結果、カスパーゼ4との結合性が失われていた。

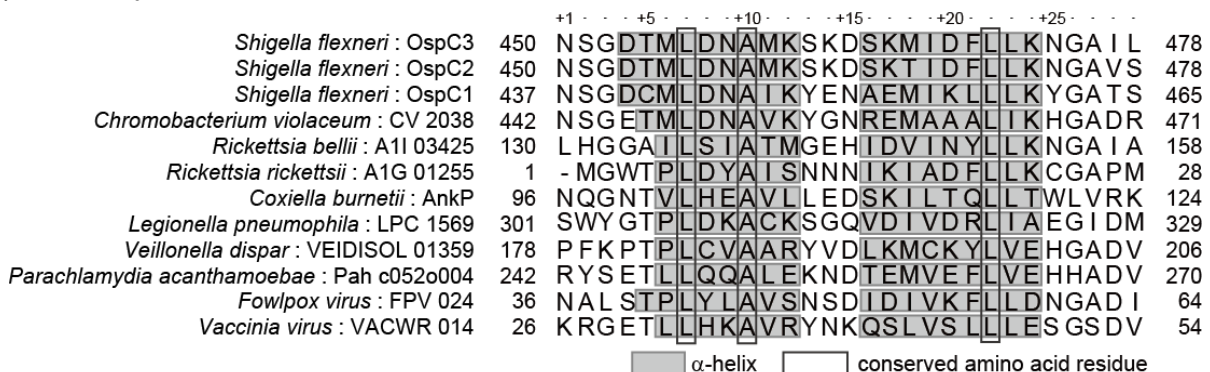


図6、OspC3のカスパーゼ4結合領域の相動性解析の結果(BLAST)

OspC3 の配列中にはカスパーゼ1の基質とされるモチーフ (LSTDN) が存在しており、この領域がカスパーゼ4の活性ポケットに侵入することで反応を阻害することが予測された (図7)。そこで、ペプチド阻害剤 LSTD を設計・合成し、OspC3 欠損株の感染細胞に添加した結果、カスパーゼ阻害剤同様に細胞死が抑制された。このことからLSTDNの領域はカスパーゼ4の基質ポケットに競合阻害的に作用できると考えた。次に、アミノ酸 LSTDN を AAAAA に変異した OspC3-AAA を作製し、発現細胞のカスパーゼ4依存的な細胞死を測定した結果、細胞死の阻害効果が減弱した。以上のことから OspC3 は2つのドメインの機能によりカスパーゼ4の活性を阻害していることが推測された (図8)。

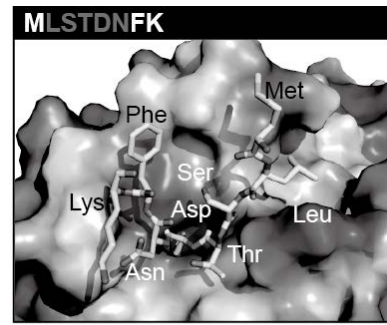


図7、カスパーゼ4の活性ポケットとOspC3のLSTDN及び前後配列

6、カスパーゼ4依存的な細胞死はサルモネラやEPECの感染細胞においても生じる

$\Delta ospC3$ の感染で生じる細胞死が、他の菌感染においても観察される普遍的な現象であることを確認するため、サルモネラと腸管病原性大腸菌(EPEC)の感染細胞において生じる細胞死を観察した。カスパーゼ1および4のノックダウン細胞における細胞死の結果から、これらの感染細胞では、カスパーゼ4依存的に細胞死が生じていることが示唆された。このことからカスパーゼ4依存的なパイロプトシスは細胞における病原体排除のための自然免疫的機構として作用する一方で、赤痢菌は OspC3 を用いて排除機構を抑制することで宿主体内での生存を助けられていると考えられる。

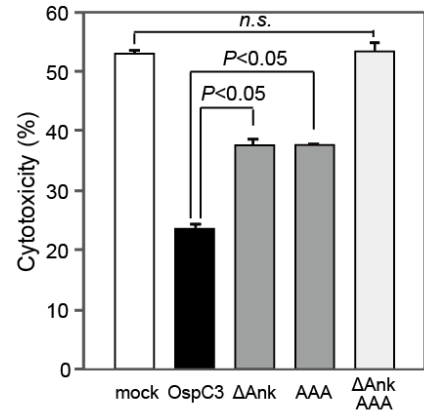


図8、OspC3 及びその変異体によるカスパーゼ4依存的細胞死抑制能

カスパーゼ4のp19およびp10を発現させることで細胞死を生じさせる系を作成し、これにOspC3及びその変異体を共発現させ、上清をLDH assayに供して細胞死を確認した。

7、まとめ

以上の結果、赤痢菌はOspC3を分泌することで、菌の感染により腸管上皮細胞に生じるカスパーゼ4依存的な細胞死を抑制し、感染細胞の足場を確保していることが示唆された。

ウイルスのカスパーゼ阻害タンパク質の報告はあるが、細菌性のはOspC3が初めての報告であり、本研究結果は他の菌のエフェクター解析に寄与するものと期待できる。またヒトカスパーゼ4のマウスオースログであるカスパーゼ11は、ノックアウトマウスにおいてパイロプトシスへの関与が報告されている。また、サルモネラはマウスに感染するとカスパーゼ1に非依存的な細胞死を誘導する。さらに、マウスによりカスパーゼ11は敗血症の原因遺伝子として報告されている。ヒト特異的病原菌である赤痢菌は、マウスオースログカスパーゼ11には結合せず、ヒトカスパーゼ4特異的に阻害活性を誘導することから、本研究によるカスパーゼ4研究が敗血症をはじめとするヒト疾患原因解明の手掛かりになることが期待される。

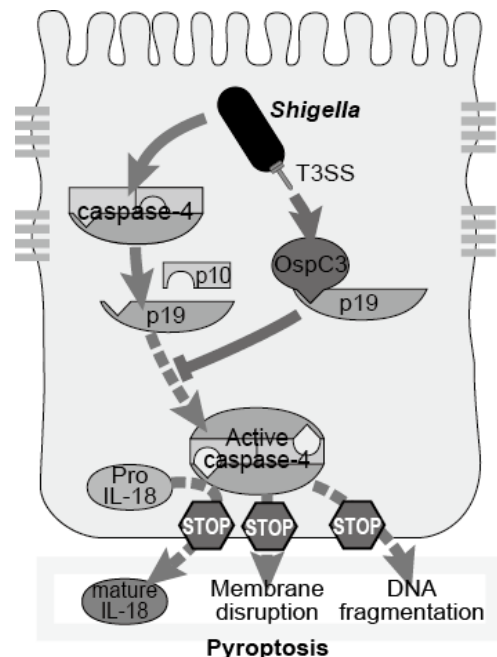


図9、まとめ