

研究課題別評価

1 研究課題名:

オートファジーによる細胞内侵入性細菌の排除機構の解析と応用

2 研究者氏名: 中川 一路

研究員: 桜井 敦朗 (研究期間 H.16.4.1~H.18.3.31)

技術員: 時森 綾 (研究期間 H.15.10.1~H.18.3.31)

3 研究のねらい:

生体内に侵入した病原性細菌は、通常貪食細胞によって捕捉され、生体内より排除される。このような貪食細胞は、取り込んだ病原性細菌をファゴソーム内に取り込み、その後リソソームとの融合を経て消化することにより、病原性細菌の生体からの排除を行っている。ところが近年、多くの病原性細菌で、非貪食系の上皮細胞などの細胞内に侵入していることが明らかにされてきた。通常好中球などの貪食細胞に補食された病原細菌は、食胞(ファゴソーム)に取り込まれ、やがてリソソームとの融合によって消化される。それでは、非貪食系細胞の細胞質内に脱出した菌はどのように消化・排出されているのであろうか?細胞には、異物の排除機構としてファゴソーム-リソソーム系以外に、通常細胞内小器官を分解するために利用される自食胞(オートファゴソーム)というメカニズム(オートファジー)が存在していることが知られている。本研究では、このオートファジーが細胞質内に侵入した病原性細菌の排除機構として機能しているのかどうか、またどのようなメカニズムで菌を認識して排除しているのかについて明らかとし、感染防御機構におけるオートファジーの役割を明らかにすることを目的とする。

4 研究成果:

(1) A 群レンサ球菌に対するオートファジーによる感染防御機構について

A 群レンサ球菌感染症の発症には本菌の宿主への付着・定着因子が重要であることが示されているが、宿主細胞への付着・侵入には、菌体表層にある M タンパクや、フィブロネクチン結合タンパクなどの複数のタンパク成分や、ヒアルロン酸で構成される夾膜が関与していることが報告されている。ところが、A 群レンサ球菌は、細胞内に高頻度で侵入することが報告されているものの、他の細胞内寄生性細菌の様に細胞内で増殖するという報告は為されていない。そこで、A 群レンサ球菌を用いて、細胞内での動態とオートファジーの関与について解析を行った。HeLa 細胞に GAS を感染させたところ、感染後1時間から、オートファゴソームの膜マーカーである LC3 陽性の膜構造に覆われ、経時的に連鎖している菌を包む様に巨大化した。同時に、オートファゴソーム形成に量が比例することが知られている LC3-II の経時的な増加が認められた。また、感染後4時間で菌体を含む LC3 陽性膜構造のほぼ全てがリソソームマーカーである LAMP1 陽性となり、リソソーム酵素阻害剤であるロイペプチンの添加により細胞内の菌数の減少が抑制された。さらに、オートファゴソーム形成に必要な Atg5 遺

伝子を欠失させた ES 細胞に GAS を感染させたところ、このような LC3 に囲まれる菌は全く観察されず、かつ Apg5 正常細胞に比較して菌の分解が著しく抑制され約 80 倍の菌が回収された。これらの結果は、細胞内に侵入した GAS の多くがオートファゴソーム様構造に取り込まれ、その後その構造とリソソームの融合によって分解されていることを示唆している。

また、オートファジーは細胞質内の分解機構であることから、A 群レンサ球菌が細胞質内に脱出しているのか否かについて検討を加えた。A 群レンサ球菌は、リステリア菌の細胞質内への脱出に必須な溶血毒素リステリオリシン O のホモログであるストレプトリシン O (SLO) が存在する。リステリア菌ではリステリオリシン O による貪食細胞での貪食胞からの脱出が知られている。そこで、A 群レンサ球菌でストレプトリシン O の遺伝子破壊株を作製し、細胞質への脱出とオートファジーによる捕獲について検討を加えた。SLO 遺伝子破壊株では、感染後 3 時間を経過した時点でもエンドソーム内に留まっているのに対して、親株では速やかに細胞質への移行およびオートファジーによる捕獲が認められた。これらの結果は、A 群レンサ球菌の細胞質への脱出には SLO が必須であり、細胞質に SLO を用いて脱出した菌が選択的にオートファジーにより取り込まれることが明らかとなった。

(2) 黄色ブドウ球菌に対するオートファジーによる認識について

A 群以外のレンサ球菌、およびブドウ球菌属の菌を用いて細胞内侵入性およびオートファゴソームによる分解が起こりえるのか否かについて検討した。レンサ球菌属では、B 群レンサ球菌、口腔内レンサ球菌に属する血清型の異なる 20 株について検討を加えたが、いずれの菌も上皮細胞には侵入性をほとんど示さず、オートファジーの誘導は認められなかった。次にグラム陽性菌の代表菌株である、ブドウ球菌属について同様の解析を行った。ブドウ球菌は、主に *S. aureus* (黄色ブドウ球菌)、*S. epidermidis* (表皮ブドウ球菌)、*S. saprophyticus* (腐性ブドウ球菌) に大別される。このうち、*S. epidermidis* (20 株)、*S. saprophyticus* (5 株) では、細胞内侵入性が認められなかった。しかし、今回供試した黄色ブドウ球菌 12 株全てで細胞内侵入性が認められ、いずれも巨大なオートファゴソーム内に菌が捕獲されていた。黄色ブドウ球菌は、ヒトや動物の皮膚、消化管内などの体表面に常在し、通常は無害であるが、皮膚の切創や刺創などに伴う化膿症や膿痂疹、毛囊炎、セツ、癰、蜂巣炎など種々の皮膚軟部組織感染症から、肺炎、腹膜炎、敗血症、髄膜炎などに至るまで様々な重症感染症の原因となる。今回用いた 12 株の黄色ブドウ球菌は、全て分離場所および発症疾患が異なるものを用いているため、黄色ブドウ球菌も細胞内に侵入し、オートファジーのターゲットとなることを示していると考えられる。

(3) オートファジーにより認識される細菌成分と細胞因子について

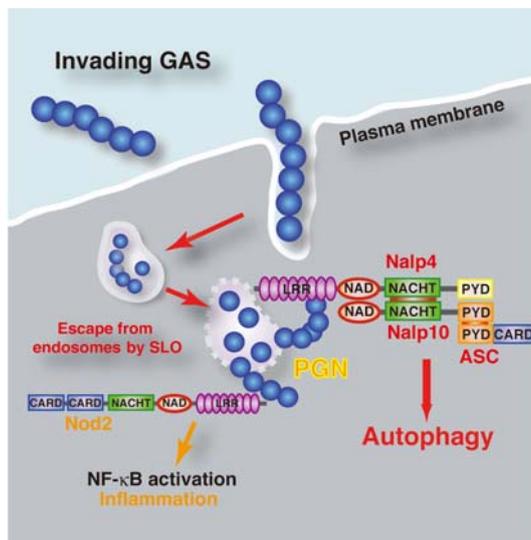


図 1. Nalp4, Nalp10 は細胞質内の A 群レンサ球菌の細胞壁成分を認識して、ASC を介した complex を形成することでオート

ファジーによる認識が著しく阻害されることが明らかとなった。そこで、さらに、この菌体成分を認識してオートファジーを誘導する細胞成分を明らかにするために、細胞質内の菌体成分認識分子である Nod-LRR ファミリー分子に着目してその関与の解析を行った。Nod-LRR ファミリー分子に網羅的に miR-RNAi によるノックダウン系を確立した。その結果、Nalp4、Nalp10 分子のノックダウンにより効果的にオートファジーの誘導の抑制、および菌の分解の抑制が認められたことから、細胞内では菌体の細胞壁成分を認識してオートファジーが選択的に誘導されていることが明らかとなった(図 1)。

A 群レンサ球菌と黄色ブドウ球菌が細胞内に侵入した後にオートファジーにより捕獲されたが、なぜ“非特異的”な細胞質の分解システムであるオートファジーが“特異的”にこれらの菌を認識して捕獲することができるのかについてさらに検討を加えた。その結果、A 群レンサ球菌の菌体表層の細胞壁成分がオートファジーにより認識されていた。A 群レンサ球菌のトランスポゾンを用いたランダム変異株を作製したところ、細胞壁合成酵素である MurD、MurE のプロモーター領域変異株でオートファジーによる認識が著しく阻害されることが明らかとなった。そこで、さらに、この菌体成分を認識してオートファジーを誘導する細胞成分を明らかにす

5 自己評価:

本研究期間内に、A 群レンサ球菌、黄色ブドウ球菌といったグラム陽性菌の代表的な株が細胞質内に侵入してオートファジーという本来は生理的に重要な分解システムを利用して効率的に分解されていることを明らかにできた。しかし、当初の目標では、曖昧ながら菌体表層の何らかのタンパク質成分が関与していると考えていたため、研究中期から後期にかけてその分離に時間を費やしてしまったことが悔やまれる。

その後に、細胞壁成分の関与が示唆されたために、その細菌側、細胞側双方からのアプローチを開始したが、予想外に細菌側の細胞壁成分が認識されていることが明らかとなってきた。残念ながら、細菌の細胞壁成分は、その構成成分や構成単位が明らかとなっているものの、本研究ではオートファジーに認識される最小成分の同定には至っていない。これは、細菌の細胞壁成分の高次構造が非常に複雑な構造のために、人工合成物が MDP 単位までしか可能とはなっていないことに由来するが、この点については、さらに種々の変異株を用い

て明らかにしたいと考えている。

また、オートファジーの誘導に関与する細胞側のファクターとして、現在注目を集めている自然免疫系のレセプター群の関与が明らかになってきたのは研究の新たな展開として期待できると考えている。特に、Nalp の遺伝子群は、ヒト細胞では 20 種類近くがゲノム解析の結果から報告されているものの、その機能は現時点でもほとんどと言って良いほど明らかとされていない。これらのレセプター群がなぜ多種細胞内に存在するのか、菌体成分の認識により宿主反応をどのように制御しているのか今後さらに研究を続けていきたいと考えている。

6 研究総括の見解:

生体内に侵入した病原細菌が生体内より排除される機構として、従来知られている貪食細胞による排除機構とは別に、オートファジーと称する機構が存在することが最近明らかになってきた。本研究では、A 群レンサ球菌と黄色ブドウ球菌に対するオートファジーによる感染防御機構について、極めて独創的な重要な新知見を見出し、感染防御機構においてオートファジーが重要な役割を担っていることを明らかにした。

7 主な論文等:

発表論文

1. Kato, T., Kawai, S., Nakano, K., Inaba, H., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Tsuda, K., Omori, H., Ooshima, T., Yoshimori, T., Amano, A. (2006) Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. *Cell. Microbiol.* In press.
2. Amano, A., Nakagawa I., Yoshimori, T. (2006). Autophagy in innate immunity against intracellular Bacteria. *J. Biochem (Tokyo)*, 140: 161–166.
3. Nakagawa I., Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A. (2006) Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect. Immun.* **74**: 3773–3782.
4. Takemura A, Nakagawa I., Kawai S, Inaba H, Kato T, Hamada S, Amano A. (2006) Inhibitory effects of tumor necrosis factor- α on migration of human periodontal ligament cells. *J. Periodontol.* **77**: 883–890.
5. Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I., Funao J, Nakayama M, Hisatsune J, Kimura M, Moss J, Hirayama T. (2006) Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J. Biol. Chem.* **281**: 11250–11259.
6. Inaba H, Kawai S., Kato T., Nakagawa I., Amano A. (2006) Association between epithelial cell death and invasion by microspheres conjugated to *Porphyromonas gingivalis* vesicles with different types of fimbriae. *Infect. Immun.* **74**: 734–739.
7. Tsuda K, Amano A, Umebayashi K, Inaba H, Nakagawa I., Nakanishi Y, Yoshimori T. (2005)

- Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle. *Cell Struct Funct.* **30**: 81–91.
8. Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S. and Ooshima, T. (2005) Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* **39**: 262–268.
 9. Tamura, K., Nakano, K., Nomura, R., Miyake, S., Nakagawa, I., Amano, A., Ooshima, T. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in Japanese children and adolescents. *J. Periodontol.* **76**: 674–679.
 10. Nakagawa, I., Amano, A., Inaba, H., Kawai, S., Hamada, S. Inhibitory effects of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae on interactions between extracellular matrix proteins and cellular integrins. (2005) *Microbes Infect.* **7**: 157–63.
 11. Nakano, K., Nomura, R., Shimizu, N., Nakagawa, I., Hamada, S., Ooshima, T. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. (2004) *J Clin Microbiol.* **42**:4925–30.
 12. Nakano, K., Nomura, R., Shimizu, N., Nakagawa, I., Hamada, S., Ooshima, T. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. (2004) *J Clin Microbiol.* **42**:4925–30.
 13. Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T. (2004) Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science.* 2004 **306**: 1037–40.
 14. Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S., Hamada, S. Transcriptome analysis and gene expression profiles of early apoptosis-related genes in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. (2004) *Cell Microbiol.* **6**:939–52.
 15. Okahashi, N., Inaba, H., Nakagawa, I., Yamamura, T., Kuboniwa, M., Nakayama, K., Hamada, S., Amano, A. *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. (2004) *Infect Immun.* **72**:1706–14.

総説など

1. 中川一路、吉森保 オートファジーによる感染防御機構 蛋白質・核酸・酵素 Vol.51(10 Suppl.), 1507–14, 2006
2. 中川一路 オートファジー(自食作用)による感染防御 Annual Review 免疫2006 p54–64
3. 中川一路 オートファジーによる防御システム:細胞内の細菌排除機構日本細菌学雑誌 Vol.60(3), 485–9, 2005
4. 中川一路 オートファジーは細胞内侵入性細菌から細胞を防御する実験医学 Vol.23(5), 734–7, 2005

受賞

平成18年度日本細菌学会黒屋奨学賞

平成18年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞

学会発表 国際2件 国内6件

招待講演 国際2件 国内シンポジウム4件