

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15130

研究課題名(和文) ライブイメージングにより細菌感染過程と感染特異的なオートファジーを可視化する

研究課題名(英文) Visualization of bacteria-induced autophagy by live-imaging.

研究代表者

中川 一路 (NAKAGAWA, ICHIRO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70294113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、A群レンサ球菌をモデルとして、感染の各ステップを可視化するプローブを選定し、これに近年開発が進む多次元蛍光イメージングシステムを導入することで、感染現象をリアルタイムで追跡し、時空間的感染過程、感染制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、感染特異的に局在するRabとして、Rab17やRab30が、また感染時に特に強く誘導がかかるRabとしてはRab35を見いだした。特に、Rab35は、菌の感染状態では、Rab35がアダプタータンパク質であるNDP52に直接結合することで、菌体へのオートファゴソームの形成に関わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we selected a probe for visualization of infection step using group A Streptococcus as a model, and introduced a multidimensional fluorescence imaging system. We found that Rab 17, Rab 30 and Rab35 could colocalized to bacteria-induced autophagosome specifically. In particular, it was revealed that Rab 35 was involved in the formation of bacteria-induced autophagosomes by direct binding to NDP 52, which is an adapter protein. These results indicate that some specific Rab proteins are important for bacteria-induced autophagy.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 オートファジー イメージング Rabタンパク質

1. 研究開始当初の背景

レンサ球菌感染症は、日本では、A群レンサ球菌で年間患者数が30万人、また、肺炎球菌感染症では、高齢化による肺炎の死亡数が、全死亡原因の上位であり、社会的に大きな問題となっている

(<http://idsc.nih.go.jp/idwr/index.html>). 肺炎球菌では耐性株が増えているだけでなく、乳幼児の髄膜炎での患者が増加していることから、莢膜抗原に対するワクチンが日本でも接種が勧められている。ところが、2000年からPCV7ワクチンが導入された米国では、肺炎球菌が新たな形質を獲得してワクチンが奏功しない株が急速に流布したことがゲノムレベルで解明された (Golubchik et al, Nature Genetics 2012). そのため、従来とは異なる視点での新規治療法が望まれている。A群レンサ球菌は、単に宿主細胞に付着するだけでなく、宿主細胞内に侵入する能力があることも知られている。その際に、侵入した菌を排除するため、宿主細胞では、通常は細胞内の不要なタンパク質を除去するのに機能しているオートファジーによって分解されてる (Nakagawa et al, Science, 2004). しかし、細菌の宿主細胞への感染現象は細胞間で単一でなく、特に時空間的に大きな誤差が生じる。そのため、感染時の特定の現象を単一細胞の追跡で捉えるのは困難とされている。また、ライブイメージング解析では特定の現象を可視化するプローブの開発、選択が鍵となるが、感染症研究ではこれらの開発もほとんど進められていない。

2. 研究の目的

本研究では、A群レンサ球菌をモデルとして、感染の各ステップを可視化するプローブを選定し、これに近年開発が進む多次元蛍光イメージングシステムを導入することで、感染現象をリアルタイムで追跡し、時空間的感染過程、感染制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。多く

の病原性細菌は宿主細胞内へ侵入し、増殖、感染拡大を図る。これに対し宿主細胞は、ファゴリソソーム経路やオートファジー経路を介して菌を分解し、感染を防御する。申請者はこれまで、ヒトの主要な病原性細菌のひとつであるA群レンサ球菌の感染メカニズムについて研究を行ない、細胞への付着・侵入メカニズムを明らかにする過程で、オートファジー経路が感染防御に機能することを発見した (Nakagawa et al. Science. 2004). さらに、感染プロセスの全てのステップにおいてキー分子となる、細胞内膜輸送系 (メンブレントラフィック) の分子スイッチ Rab/Rho GTPase タンパク質の網羅的解析を行ない、感染の各ステップに関わる分子の同定と、感染時特異的なオートファジーの制御因子を明らかにしてきた

(Nakagawa et al., PLoS Pathog. 2011; Sakurai et al., J Biol Chem. 2011; Nozawa et al., Cell Microbiol. 2012, 2014; 一部未発表) 感染に対する宿主応答の時空間的制御メカニズムを明らかにし、これを可視化する技術は、感染過程の全容の解明、さらには感染症に対する薬剤スクリーニングなどの医療、産業面での応用に必須であると考え、本研究の起案に至った。

3. 研究の方法

1) 菌の感染過程の可視化プローブの作成

Rab5/RhoA/Rac1/Cdc42 は細菌が細胞内へ侵入する際に活性化し、菌の取り込みに機能することが知られている。また、これまでの申請者の報告から、通常の細胞では機能が明らかとなっていない Rab タンパク質が関与していることが分かっている。また、これらにはそれぞれ GTP 型 GDP 型へ変換する分子が必要である。そこでこれらの蛍光タンパク融合体から、この活性化の時空間的解析を行うために、それぞれの遺伝子

を網羅的にカバーするため、ほぼ全ての遺伝子のクローニングを行い蛍光タンパク質との融合体の発現ベクターを構築した。

2)感染時特異的なオートファジーの誘導解析とこの活性を可視化するプローブの開発

細胞内センサータンパク質を介したオートファジー誘導の時空間的制御機構の解析

申請者らは以前、病原体の細胞内センサータンパク質である Nod-like receptor (NLR) の一つである NLRP4 が A 群レンサ球菌感染時に、Rho GTPase の制御因子の RhoGDI を介して RhoA/Cdc42 活性化し、オートファゴソーム形成誘導を制御していることを明らかにしている。そこで、分子間型 (2 分子型) FRET センサーを作製した。FRET とはある励起された分子 (ドナー) から近接する分子 (アクセプター) へエネルギーが共鳴現象により移動する現象を指す。FRET は互いの分子間の距離に大きく影響を受け、多くの場合は 1-10 nm の範囲でしか観察できない。これはタンパク質が複合体を形成する距離に近いので、ドナーとアクセプターの二分子間の相互作用を分光学的に評価することができる。申請者らが同定してきた、感染時のオートファジー特異的に機能する Rab タンパク質について、生きた細胞内で活性化を可視化できる分子内 (1 分子型) FRET バイオセンサーの開発を試みた。今回、ドナーに CFP 融合 NLRP4、アクセプターに YFP 融合 RhoGDI を用い、感染時の FRET シグナルを解析することで、菌の認識からオートファゴソーム形成誘導が起きる時空間的情報の解析を行った。また、同様に近接する分子間のインタラクションを可視化する方法として、proximity ligation assay (PLA) も利用した。これは、分子によっては、蛍光タンパク質の過剰発現によって細胞機能に異常をきたす可能性がある。特に、RhoA は、欠損細胞で細胞の

極性や細胞形態そのものが大きく影響されるため、上記の方法は適さない可能性があった。PLA では、内在性に発現している分子のうち、特異性の高い抗体があるものについては、多少の方法の改良は必要なものの、高感度でインタラクションを起こしている分子のみを特異的に検出することができる。

今回、ドナーに CFP 融合 NLRP4、アクセプターに YFP 融合 RhoGDI を用い、感染時の FRET シグナルを解析することで、菌の認識からオートファゴソーム形成誘導が起きる時空間的情報を明らかにする。

3)感染時特異的なオートファジーの活性を可視化するプローブの開発

FRET の原理と GFP を応用し、一分子にすべてのバイオセンサーパーツを取り込み、Ras スーパーファミリーの活性をイメージングするために開発されたのが、活性モニター分子 Raichu (Ras and interacting protein chimeric unit) である。近年では Raichu に extended variable (EV) リンカーを導入し、種々のリン酸化酵素および Rab GTPase の FRET バイオセンサーが開発されている (Mol Biol Cell. 2011. 22:4647-56)。作製したセンサー (野生型、恒常活性型、優勢劣性型) を発現させた HeLa 細胞の蛍光スペクトルを蛍光分光光度計で計測し、十分なダイナミックレンジを持つことを確認。またこの FRET センサーの FRET/CFP 比が Rab の不活性化因子の量依存的に低下することを確認した。さらに、センサーは Rab と同じ細胞内局在を示すことを、FRET センサーと mRFP-Rab を HeLa 細胞に同時に発現させて顕微鏡観察することにより確認した。オートファジーの膜マーカータンパク

質に GFP を付したトランスジェニックマウスやオートファジー部分欠損細胞マウスに細菌を感染させ、多光子励起レーザー顕微鏡による解析を行った。

4. 研究成果

A群レンサ球菌を上皮細胞に感染させると高頻度で細胞内に侵入し、オートファゴソームによって菌が捕獲され、分解される。この過程で形成されるオートファゴソームは飢餓で誘導されるオートファゴソームと比較すると Atg5 に依存して膜形成される点は共通であるが、直径が飢餓誘導時のオートファゴソームと比較すると 50 倍近くになるため、細胞内で多量の膜成分が供給されることが予測される。そのため、本研究では、細胞内でのトラフィックに関わる Rho, cdc42, Rac1 や Rab タンパク質群に着目し、その動態を観察するプローブとして利用することで感染動態を可視化した。

ヒトでは Rab タンパク質は 60 種類以上同定されているが、その機能の解明が進んでいるのは、ごく一部である。エンドソームの形成に重要な Rab5、リソソームとの融合に必須である Rab7 については比較的研究が進んでいるが、それ以外の分子では多くの知見は得られていない。また、Rab の活性化と不活化に重要である GEF と GAP については、ほとんど知られていない。さらに、それぞれの Rab のエフェクターについても、ごく少数が知られているだけである。そこで、これらの遺伝子の蛍光発現体、ノックダウンベクターを作成して、感染細胞での動態を観察した。

その結果、細菌感染特異的なオートファゴソームに強く結合する Rab タンパク質を同定することができた。さらに、エフェクターや GEF についても、感染特異的に誘導されるものを見いだした。

まず 感染特異的に局在する Rab として、

Rab17 や Rab30 が、また感染時に特に強く誘導がかかる Rab としては Rab35 を見いだした。このうち、Rab17 は、本菌の感染時に誘導されるオートファゴソームの膜のみに局在が認められるが、この結果から膜の供給源として通常は使われないリサイクリングエンドソームが利用されることが明らかとなった。さらに、Rab35 は、通常もエンドソーム膜に局在するが、菌の感染状態では、Rab35 がアダプタータンパク質である NDP52 に直接結合することで、菌体へのオートファゴソームの形成に関わっていることが明らかとなった。さらに、この誘導には Rab35 の GAP である TBC1D10A が関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件) 代表論文を 6 件掲載

1. Roobthaisong A, Aikawa C, Nozawa T, Maruyama F, Nakagawa I. YvqE and CovRS of Group A *Streptococcus* Play a Pivotal Role in Viability and Phenotypic Adaptations to Multiple Environmental Stresses. PLoS One. 12(1):e0170612. 2017.
2. Nakajima S, Aikawa C, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Toh H, Nakagawa I. Bcl-xL Affects Group A *Streptococcus*-Induced Autophagy Directly, by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes, and Indirectly, by Inhibiting Bacterial Internalization via Interaction with Beclin 1-UVRAG. PLoS One. 12(1):e0170138. 2017.

3. T. Nozawa, A. Minowa-Nozawa, C. Aikawa, I. Nakagawa. The STX6-VTI1B-VAMP3 complex facilitates xenophagy by regulating the fusion between recycling endosomes and autophagosomes. *Autophagy*, 13:57-69, 2017.
 4. K. Hirayasu, F. Sito, T. Suenaga, K. Shida, N. Arase, K. Oikawa, T. Yamaoka, H., H., Murota, H. Chibana, I. Nakagawa, T. Kubori, H. Nagai, Y. Nakamura, I. Katayama, M. Collonna, H. Arase. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nature Microbiol.* 1. 16054, 2016.
 5. S. Oda, T. Nozawa, A. Nozawa-Mitsuwa, M. Tanaka, C. Aikawa, I. Nakagawa. Golgi-resident GTPase Rab30 Promotes the Biogenesis of Pathogen-Containing Autophagosome *PLoS One* 11(1): e0147061 2016.
 6. T. Nozawa and I. Nakagawa "Rab Proteins in Autophagy: *Streptococcus* Model" *Autophagy, Infection, and the Immune Response*, 2015.
- 〔学会発表〕(計 19 件) 15 件記載
1. 中川一路 “細菌感染とオートファジー” 第 90 回日本細菌学会総会 仙台国際センター(仙台) 2017 年 3 月 19 日—21 日
 2. 藤 博貴, 相川 知宏, 中島 慎太郎, 野澤 孝志, 野澤 敦子, 中川 一路 *Streptococcus pyogenes* NADglycohydrolase as negative regulator for internalization into HeLa cell . s 第 90 回日本細菌学会総会第 90 回日本細菌学会総会 仙台国際センター(仙台) 2017 年 3 月 19 日—21 日
 3. 中島 慎太郎, 相川 知宏, 野澤 孝志, 野澤 敦子, 藤 博貴, 中川 一路 Bcl-xL regulates Group A Streptococcus internalization to host cell and autophagosome-lysosome fusion 第 90 回日本細菌学会総会 仙台国際センター(仙台) 2017 年 3 月 19 日—21 日
 4. 山田 俊介, 相川 知宏, 野澤 孝志, 中川 一路 A 群レンサ球菌ゲノム上のプロファージが宿主の遺伝子発現に及ぼす影響の解明について第 90 回日本細菌学会総会 仙台国際センター(仙台) 2017 年 3 月 19 日—21 日渡辺 孝康, 芝多佳彦, 加地 博一, 村瀬 一典, 竹内 康雄, 丸山 史人, 和泉 雄一, 中川 一路 細菌叢遺伝子発現解析によるインプラント周囲炎および歯周炎の疾患特異的な細菌ネットワーク 第 90 回日本細菌学会総会 仙台国際センター(仙台) 2017 年 3 月 19 日—21 日
 5. 相川 知宏, 星野 将人, 長門石 暁, 津本 浩平, 中川 一路 Identification of novel inhibitor for Group A Streptococcus growth 第 90 回日本細菌学会総会 仙台国際センター(仙台) 2017 年 3 月 19 日—21 日
 6. 野澤孝志、中川一路 A 群レンサ球菌は NAD-glycohydrolase によりゴルジ体断片化を誘導しサイトカイン分泌経路を阻害する 第 49 回レンサ球菌研究会 長崎大学(長崎) 2016 年 7 月 8 日-9 日
 7. 中川一路, 星野将人, 相川知宏, 津本浩平 細菌表層機能分子をターゲットとした分子標的薬開発 長崎大学(長崎) 2016 年 7 月 8 日-9 日
 8. 中川一路 細菌分子による細胞内メンブレントラフィックの制御-A 群レンサ球菌をモデルとして- 第 25 回内毒

- 素・LPS 研究会 慶應義塾大学(東京)
2016年6月25日
9. 野澤 敦子, 野澤 孝志, 中川 一路
Rab35 regulates the ubiquitin-binding adaptor protein NDP52 in selective antibacterial autophagy 第89回日本細菌学会総会 大阪国際会議場(大阪)
2016年3月23日—25日
 10. 相川知宏, 野澤孝志, 中島慎太郎, 丸山史人, 中川一路 Nod like receptor NLRX1 は GAS 感染による オートファジーを制御する第89回日本細菌学会総会 大阪国際会議場(大阪) 2016年3月23日—25日
 11. 野澤 孝志, 野澤 敦子, 中川 一路 A Disrupted PI4P-Enriched TGN Induced by Group A Streptococcus Contributes to Xenophagy 第89回日本細菌学会総会 大阪国際会議場(大阪) 2016年3月23日—25日
 12. 山田 俊介, 相川 知宏, 野澤 孝志, 中川 一路 A 群レンサ球菌ゲノム上のプロファージが宿主 の遺伝子発現に及ぼす影響の解明について 第89回日本細菌学会総会 大阪国際会議場(大阪) 2016年3月23日—25日
 13. Tejaswini Kulkarni, 相川 知宏, 野澤 孝志, 丸山 史人, 中川 一路 Detection And Characterization of Asymptomatic Group A Streptococcus in Healthy Adults 第89回日本細菌学会総会 大阪国際会議場(大阪) 2016年3月23日—25日
 14. 大田 篤, 村瀬 一典, 丸山 史人, 中川 一路 Methylome diverfication through mobile elements acquisition in Streptococcus pyogenes
 15. 中島 慎太郎, 野澤 孝志, 相川 知宏, 丸山 史人, 中川 一路 細菌感染特異的オートファジーにおけるアポ トーシ

ス抑制タンパク質 Bcl-xL の機能解析
第89回日本細菌学会総会 大阪国際会議場(大阪) 2016年3月23日—25日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 一路 (NAKAGAWA, Ichiro)
京都大学大学院医学研究科微生物感染症学分野・教授
研究者番号: 70294113

(2) 研究分担者

野澤 孝志 (NOZAWA Takashi)
京都大学大学院医学研究科微生物感染症学分野・助教
研究者番号: 10598858

(3) 研究分担者

相川 知宏 (AIKAWA Chihiro)
京都大学大学院医学研究科微生物感染症学分野・助教
研究者番号: 70725499