

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790318

研究課題名（和文）結核菌の食胞形成過程における膜小胞輸送機構のリアルタイムイメージ解析

研究課題名（英文）Image analysis of membrane trafficking in phagocytosis of mycobacteria

研究代表者

瀬戸真太郎 (SETO SHINTARO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50383208

研究成果の概要：

蛍光ラベルした *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv（結核菌）を、GFP 融合各種 Rab GTPase を発現する Raw マクロファージ細胞に感染させて、Rab タンパク質が局在している結核菌ファゴソームの割合を共焦点レーザー顕微鏡で調べて、黄色ブドウ球菌ファゴソームと比較した。Rab8、Rab9、Rab22bなどは黄色ブドウ球菌、結核菌ファゴソームと同様の局在変化を示した。Rab11、Rab20、Rab37は黄色ブドウ球菌ファゴソームに局在するが、結核菌ファゴソームには局在しなかった。Rab23、Rab34、Rab39はRab7と同様に結核菌ファゴソームに局在するが、その局在は黄色ブドウ球菌に比べて制限されていた。

結核菌ファゴソームからかい離する Rab GTPase のファゴソーム熟成における機能を明らかにするために、これらのドミナントネガティブ変異体を発現するマクロファージにおいて、ファゴソームの酸性化とファゴソームへのカテプシン D の局在を調べた。Rab7、Rab20、Rab39はファゴソームの酸性化に、Rab7、Rab20、Rab32、Rab34、Rab38がカテプシン D のファゴソームへの局在に関与することが明らかになった。以上の結果は、ファゴソーム熟成とファゴリソーム形成に数種類の Rab タンパク質が関与すること、結核菌はこれらの Rab タンパク質の細胞内局在を変調させることによって細胞内寄生を獲得していることを示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：結核菌・マクロファージ・Rab GTPase・ファゴソーム熟成

## 1. 研究開始当初の背景

*Mycobacterium tuberculosis*（結核菌）は細胞内寄生性細菌で、貪食されたマクロファ

ージ内で細胞増殖を行うことができる。結核菌の細胞内増殖能はファゴリソーム形成を阻害することによって獲得している。これま

で、結核菌は多量のアンモニアを産生して、ファゴリソーム形成を阻害することが示唆されている。また、結核菌体膜成分の糖脂質もファゴリソーム形成を阻害するといわれている。結核菌やその類縁の抗酸菌のゲノムプロジェクトは完了しており、トランスポゾン変異株ライブラリーとマイクロアレイを用いて結核菌の病原性決定遺伝子やマクロファージ内における増殖に必要な遺伝子の同定が行われている (PNAS. 2003; 100: 12989-94, PNAS. 2005; 102: 8327-32)。しかし、明確なファゴリソーム形成阻害因子の同定や、結核菌因子と宿主細胞因子の相互作用についてはまったく明らかになっていない。

近年、細胞内小胞輸送の研究は非常に発展し、さまざまな分子が同定され、その機能が解明されつつある。結核菌感染マクロファージにおける小胞輸送の研究は、主に Deretic 等の研究グループによって行われている。Deretic 等は、小胞輸送を制御する Rab GTPase に注目して、後期エンドソームマーカーである Rab7 が、結核菌ファゴソームに局在しないことを示している。このことは、Rab7 が結核菌ファゴソームに局在しないために、ファゴリソーム形成が阻害されることを示唆する (Annu Rev Cell Dev Biol. 2004; 20: 367-94.)。また、Rab14 や Rab22a が結核菌ファゴソームに局在することによってファゴソーム熟成を阻害することを示している (EMBO J. 2006, 25: 5250-9, J Cell Biol. 2006, 174: 923-9)。しかし、結核菌感染マクロファージにおいて網羅的に Rab GTPase の局在を明らかにした研究はこれまでなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、結核菌ファゴソームに (a) 食食直後に後期エンドソーム小胞が融合する機構と (b) 後期エンドソーム小胞やリソソーム小胞が解離する機構を調べることによって、結核菌のファゴリソーム形成阻害における膜小胞輸送機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) GFP 融合 Rab GTPase 発現マクロファージ: pEGFP-C1 にマクロファージ発現 Rab GTPase をクローニングしたプラスミドを作成した。これらのプラスミドをもちいて、Raw264.7 マクロファージ細胞に電気穿孔法によって遺伝子導入した。

(2) 結核菌感染マクロファージの顕微鏡観察: 遺伝子導入を行ったマクロファージ細胞

に結核菌を感染させた。結核菌感染マクロファージを 1% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で固定して、PBS で洗浄後に顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察は LS-1 共焦点レーザー顕微鏡システム (横河電機) を用いて行った。(3) 免疫染色: 結核菌感染マクロファージを 3% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で固定して、PBS で洗浄した後、カテプシン D 抗体を用いて免疫染色を行った。その後、顕微鏡観察を行った。

## 4. 研究成果

(1) 後期エンドソームマーカータンパク質である Rab7 はこれまで結核菌ファゴソームには局在しないといわれていた。しかし、本研究の結果、感染 30 分後の 80% 以上の結核菌ファゴソームに Rab7 が局在することが明らかになった。その後、Rab7 は結核菌ファゴソームからかい離して、感染 6 時間後には、Rab7 陽性結核菌ファゴソームは 30% まで減少した。

(2) ファゴリソーム形成を促進する RILP タンパク質は感染 30 分後には 30% の結核菌ファゴソームに局在していたが、その後、増加しなかった。

(3) リソソームマーカータンパク質である CD63 は結核菌ファゴソームには局在しないといわれていた。しかし、CD63 は結核菌ファゴソームに感染 6 時間後において局在していた。

(4) 他のリソソームマーカータンパク質である LAMP-2 も感染 30 分後に結核菌ファゴソームに局在したが、その後減少した。

(5) 40 のマクロファージ発現性 Rab GTPase を GFP 発現プラスミドベクターにクローニングした。マクロファージにおいてこれらの GFP 融合 Rab GTPase の発現を確認できた。

(6) 黄色ブドウ球菌ファゴソームと結核菌ファゴソームに局在する Rab 遺伝子を比較した。黄色ブドウ球菌ファゴソームには 20 の Rab 遺伝子が局在したが、結核菌ファゴソームにはそのうちの 15 の Rab 遺伝子に局在変化を確認した。

(7) これらのドミナントネガティブ変異体を発現するマクロファージにおいて、ファゴソームの酸性化とファゴソームへのカテプシン D の局在を調べた。Rab7、Rab20、Rab39 はファゴソームの酸性化に、Rab7、Rab20、Rab32、Rab34、Rab38 がカテプシン D のファゴソームへの局在に関与することが明らかになった。

(8) これまで、結核菌ファゴソームには初期エンドソームタンパク質は局在するが、後期エンドソームタンパク質やリソソームタンパク質は局在せず、ファゴソーム熟成が阻害されていると考えられていた。本研究におい

て、ファゴソーム熟成とファゴリソーム形成に数種類の Rab タンパク質が関与すること、結核菌はこれらの Rab タンパク質の細胞内局在を変化させることによって細胞内寄生を獲得していることを示唆する。

#### 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 4 件)

(1) Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, Yamamoto M, Otsuka K, Abe K, Ochiai K. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. J Dent Res. 87. 51-55. 2008. 査読有り

(2) Seto S, Kurita-Ochiai T, Ochiai K. Increased susceptibility to tumor necrosis factor-alpha in butyric acid-induced apoptosis is caused by downregulation of cFLIP expression in Jurkat T cells. Microbiol Immunol. 52. 188-196. 2008. 査読有り

(3) Hashimoto D, Nagata T, Uchijima M, Seto S, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nakamura H, Koide Y, Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from Mycobacterium tuberculosis induces specific CD8+ T-cell responses in the lung., Vaccine. 26. 5095-5100. 2008. 査読有り

(4) Uenoyama A, Seto S, Nakane D, Miyata M, Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of Mycoplasma mobile gliding machinery, suggested by use of inhibitory antibodies and mutants., J Bacteriol 191. 1982-1985. 2009

[学会発表](計 4 件)

(1) 瀬戸真太郎、小出幸夫 結核菌感染マクロファージにおける Rab タンパク質局在の網羅的イメージ解析 日本細菌学会, 2007

(2) Seto S and Koide, Y, Live *Mycobacterium tuberculosis* blocks phagosome-lysosome fusion by dissociation of late endosomal protein, Rab7, from phagosomes in macrophages, US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM 42nd Tuberculosis and

Leprosy Research Conference, 2007

(3) Seto S, Koide Y, *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases in attenuation of phagosome maturation. Keystone symposium, 2009

(4) 瀬戸真太郎、小出幸夫, 結核菌によるファゴソーム局在性 Rab GTPase の局在変化とファゴリソーム形成阻害機構の解析, 2009

[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 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸真太郎 (SETO SHINTARO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 50383203

