

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16241

研究課題名(和文) A群レンサ球菌の細胞外脱出に関するメカニズムと生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism and biological significance of bacterial exit from infected cells during group A streptococcus infection

研究代表者

野澤 敦子 (Nozawa, Atsuko)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：60824159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：咽頭炎や膿痂疹などの起原菌であるA群レンサ球菌(GAS)は細胞内に侵入後、膜輸送制御分子であるTBC1D18によってエンドサイトーシスとリサイクリングエンドソームを介したエキソサイトーシス(細胞外脱出)が制御される。本研究では、TBC1D18の相互作用分子として宿主タンパク質であるRab10, RHOQ, ARL10を同定し、これらの分子がそれぞれエンドサイトーシスやエキソサイトーシスに参与することを明らかにした。また、GASが分泌するストレプトリジンO(SLO)やNADグリコヒドラーゼ(Nga)は細胞内のカルシウム濃度を上昇させることでGASのエキソサイトーシスに参与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A群レンサ球菌(GAS)はヒトの咽頭炎や化膿性皮膚感染症などの原因菌としてよくみられる一方で、軟部組織壊死や敗血症性ショックを伴う劇症型レンサ球菌感染症(STSS)が世界各国で報告され、近年、日本においても患者数は増加傾向にある。STSSは発病から病状の進行が急激で、致死率も約30%と高いことから、医学的重要性は極めて高い。今回の結果は、GASの「細胞外脱出」という新概念を介したGASの病態発症機序の解明に繋がり得る知見であり、学術的な観点だけでなく、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の治療法開発やワクチン開発に発展する臨床応用に向けた観点からも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Group A Streptococcus (GAS) typically invades epithelial cells and is transported by host membrane trafficking in infected cells. Since we have already revealed the RAB GTPase activating protein 1-like (TBC1D18) regulates exocytic and endocytic trafficking of the invading Group A Streptococcus, the present study aimed to extensively examine interaction factors of TBC1D18 and bacterial factors that are involved in bacterial exit from infected cells during GAS infection.

TBC1D18 interacted with Rab10, RHOQ, and ARL10, respectively. Rab10 and RHOQ regulated endolysosomal trafficking and subsequent autophagy induction and ARL10 regulated exocytic process via endocytic recycling during GAS infection. On the other hand, bacterial secretory protein, SLO and Nga, were required for exocytosis of GAS (bacterial exit from infected cells) through increasing intracellular calcium level. These interaction factors of TBC1D18 and bacterial factors are critical for intercellular trafficking of GAS.

研究分野：細菌学

キーワード：TBC1D18 RabGAP1L RHOQ Rab10 ARL10 SLO Nga A群レンサ球菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A群レンサ球菌はヒトの咽頭炎や膿痂疹などの起因菌として知られるが、時に軟部組織壊死や敗血症性ショックを伴う致死性の高い劇症型感染症も引き起こす。A群レンサ球菌が劇症型レンサ球菌感染症を引き起こすには上皮細胞層の突破を含めた急激な感染拡大が必要であると考えられるが、その感染拡大機構や経路は不明な点が多い。近年、A群レンサ球菌が宿主上皮細胞内に侵入した後、リサイクリングエンドソームを介して細胞外へ脱出していることが新たにわかってきており、感染拡大要因としての関連が注目される。しかしながら、A群レンサ球菌のリサイクリングエンドソームを介した細胞外脱出に関する分子メカニズムやその生物学的意義については全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、GASの細胞内動態の一つとしてGASの“細胞外脱出”に着目し、その根幹を担う3つの「問い」i) リサイクリングエンドソームを介した細胞外脱出に必要な宿主因子は何か、ii) 菌側の因子(SLO)はどのように細胞外脱出に関与するのか、iii) その生物学的意義は何か、について明らかにする。

3. 研究の方法

目的に応じてHeLa細胞(野生型もしくはノックアウト細胞)にEmGFP-(もしくはmCherry)融合TBC1D18などのタンパク質やsiRNAをトランスフェクション(遺伝子導入)し、過剰発現またはノックダウンを行い、GASを感染させてオートファゴソームのマーカであるLC3や傷害を受けたエンドソームのマーカとして広く使用されているGalactin 3やリサイクリングエンドソームのマーカであるRab11Aの細胞内局在を免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察を行った。

4. 研究成果

A群レンサ球菌(group A streptococcus: GAS)は細胞内にエンドサイトーシスで侵入後、エンドソーム膜を破壊し細胞質に逃れるが、オートファジーと呼ばれる細胞内の分解経路によって分解される。一方、GASは膜輸系であるリサイクリングエンドソームを介して細胞外に脱出することが明らかになっている。このエンドサイトーシスからオートファジーに至るまでの経路を負に制御し、リサイクリングの経路を正に制御するのがRabGAP1Lであることが明らかになっていたため、質量分析によりRabGAP1Lと相互作用する候補分子の同定を行い、その分子についての機能解析を行った(図1)。まず、質量分析によりRabGAP1Lと相互作用する候補分子として約500以上の宿主タンパク質が同定された。RabGAP1Lによるエンドサイトーシス経路とリサイクリング経路の制御がRabGAP1LのGAPとしての酵素活性依存

的なものであることが明らかになっていたことから、特にGTPaseとして報告されている9種のタンパク質分子に着目することとした。これらの9種のタンパク質をそれぞれノックダウンし

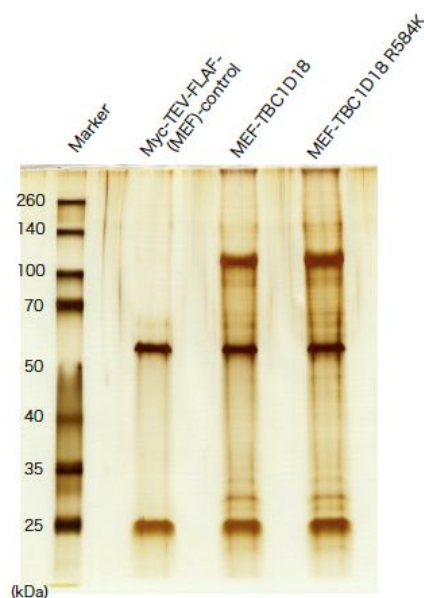


図1. 質量分析

た細胞にGASを感染させて、LC3、Galectin3、Rab11Aの感染細胞中の局在を調べたところ、RHQQおよびRab10ノックダウン細胞においてLC3及びGalectin 3のGASへのリクルートが減少していた(図2,3)。一方、ARL10ノックダウン細胞においてRab11のGASへのリクルートが増加していた(図4)。つまり、RHQQおよびRab10はエンドサイトーシ経路の制御に関与し、ARL10はリサイクリング経路の制御に関与していることが明らかになった。また、免疫沈降によりRHQQ、Rab10およびARL10が非感染細胞及び感染細胞中でTBC1D18と相互作用していることを確認した。

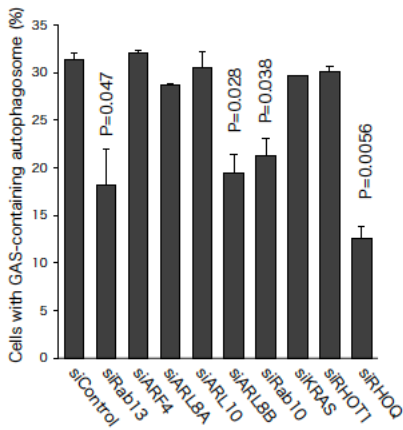


図2

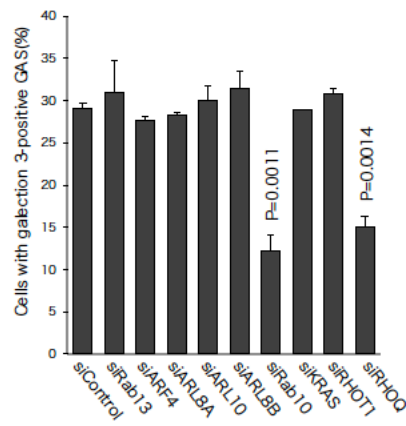


図3

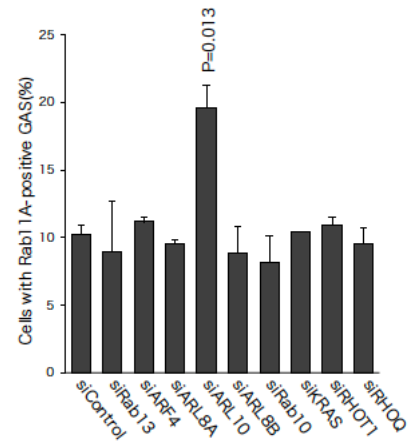


図4

さらに、GASの細胞外脱出に関与する菌側の因子についての同定と機能解析を行った。まず、菌側の因子についてはGASが分泌する溶血毒素であるストレプトリジン0(SLO)が GASの細胞内脱出に必須であることが明らかになっていたので、SLOと相互作用し、病原性との関連も示唆されている菌側の因子NADグリコヒドラーゼ(Nga)についても解析を行った。その結果、NgaもGASの細胞外脱出に関与することが明らかになった(図5)。次に、SLOとNgaがリサイクエンドソームを介した細胞外脱出にどの段階で関与するのかを調べるために、SLOまたはNgaが欠損したGASの感染細胞においてリサイクリングエンドソームのマーカであるRab11Aの局在を共焦点顕微鏡で観察をしたところ、GASを含んだリサイクリングエンドソームが細胞内で多く蓄積しているのが観察された。つまりSLOとNgaはGASを含んだリサイクリングエンドソームの形成を阻害するのではなく、リサイクリングエンドソームの中に含まれるGASを細胞外に放出(エキソサイトーシス)するのを阻害することが明らかになった。エキソサイトーシスは細胞内の二次メッセンジャーとして知られるカルシウム(Ca²⁺)に依存的なものと非依存的なものに分類される。また、SLOはGAS感染細胞において細胞内のCa²⁺濃度を上昇させることがすでに報告されていることから(文献1)、Ca²⁺に着目して解析を行った。その結果、SLOだけでなくNgaにも細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる作用があることを新たに見出した。さらに、カルシウムキレーターであるBAPTA-AMを用いてGAS感染細胞内におけるRab11Aの局在を調べたところ、BAPTA-AMを作用させた細胞においてはRab11A陽性のGASがコントロールの細胞と比較して多くなっていることが明らかになり(図6)、BAPTA-AMを作用時のGASの細胞外脱出を実際に調べるとはCa²⁺依存的であることが明らかになった。つまり、GASはカルシウム(Ca²⁺)に依存的なエキソサイトーシスにより細胞外に脱出していることが明らかになった。

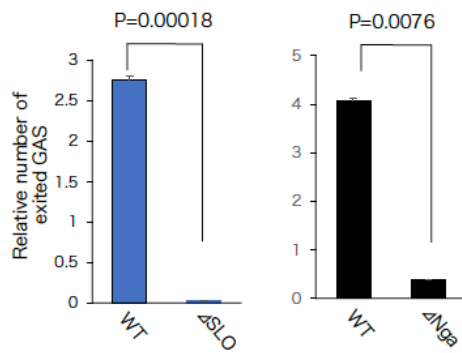


図5. SLOとNgaの細胞外脱出への関与

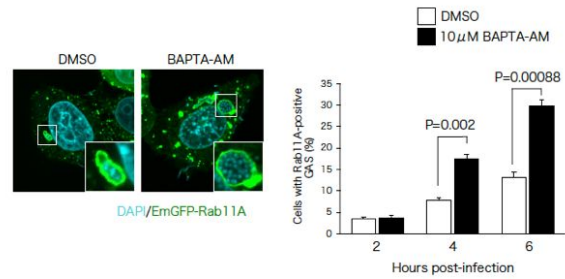


図6. 細胞内Ca²⁺のGAS細胞外脱出への関与

今回の研究成果はA群レンサ球菌感染症における新概念とも言える「細胞外脱出」のメカニズム解明に寄与するものである。本研究内容は全く新しい知見であり国内外ともにインパクトの高いものであると考えられ、現在、本研究内容の論文を投稿中である。今後は、細胞外脱出したGASがどのように感染拡大に及ぶのかに焦点を置き研究を続ける予定である。

引用文献

1. Cywes Bentley C, Hakansson A, Christianson J, Wessels MR. Extracellular group A Streptococcus induces keratinocyte apoptosis by dysregulating calcium signalling. Cell Microbiol. 2005 Jul;7(7):945-55. doi: 10.1111

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minowa-Nozawa Atsuko, Nozawa Takashi, Takamatsu Daisuke, Yoshida Akemi, Murase Kazunori, Kikuchi Taisei, Ishida-Kuroki Kasumi, Nitta Yoshihiro, Sekizaki Tsutomu, Nakagawa Ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Two Streptococcus suis Strains Isolated from Asymptomatic Pigs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01142-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01142-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hikichi Miyako, Toh Hiroataka, Minowa-Nozawa Atsuko, Nozawa Takashi, Nakagawa Ichiro	4. 巻 2022
2. 論文標題 Guanylate-Binding Protein 1 Regulates Infection-Induced Autophagy through TBK1 Phosphorylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 1~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/8612113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------