

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659108

研究課題名（和文） マクロファージ細胞内のレジオネラを認識する宿主複合体の同定

研究課題名（英文） Identification of the host factors involved in the response of macrophage cells to *Legionella pneumophila* infection

研究代表者

菖蒲池 健夫 (SHOBUIKE TAKEO)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：70336113

研究成果の概要（和文）：Naip5を安定発現するRAW264マクロファージ細胞株を作製し，マクロファージの生存におけるNaip5の作用について検討した．Naip5はレジオネラ感染時にはカスパーゼ1を活性化して細胞死を促進する一方，DNA傷害時にはカスパーゼ3および7の活性を抑制して細胞死を阻害することを見いだした．このことは，Naip5が，マクロファージ内で生じたシグナルの種類に応じたカスパーゼと複合体を形成してその活性を調節し，マクロファージの生存を制御している可能性を示唆する．

研究成果の概要（英文）：To investigate the role of Naip5 in macrophage survival, RAW264 macrophages expressing Naip5 were constructed. Naip5 promoted cytotoxicity in *Legionella pneumophila*-infected cells. This cytotoxicity was associated with caspase-1. In addition, Naip5 restricted the intracellular growth of *L. pneumophila* in RAW264 cells. *L. pneumophila* flagellin was required for cytotoxicity, caspase-1 activation, and restriction of intracellular bacterial growth. Moreover, Naip5 inhibited camptothecin-induced apoptosis in macrophages. These data indicate that Naip5 regulate cell survival by inhibiting apoptosis or by promoting pyroptosis in response to specific cellular signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	0	1,300,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：細胞死，マクロファージ，レジオネラ，カスパーゼ，

1. 研究開始当初の背景

通常、生体内に進入した細菌は、食細胞に貪食されて殺菌されるが、レジオネラは宿主の殺菌機構を回避して食細胞内で増殖する。ヒトのレジオネラ肺炎は、レジオネラの食細胞内寄生性に依存している。ヒトとは異なり、マウスのマクロファージではレジオネラの細胞内増殖が阻害される。細胞内増殖の抑制に関与する因子として、宿主(マウス)の *Naip5*, *Nlrc4*, *Caspase-1* と、レジオネラのフラジェリンが知られており、*Nlrc4* による *Caspase-1* の活性化がフラジェリンに依存して起こることが、レジオネラの細胞内増殖の抑制に重要であると推定されていた。一方、*Naip5* が関与するレジオネラの細胞内増殖の抑制もフラジェリンに依存しているが、詳細な分子機構は不明であった。

細胞内の病原体センサーと考えられている *Nod-like receptor (NLR)* は 20 以上同定されており、一部については細胞内の病原体の「なにを」認識しているか、についても明らかにされていた。例えば *Nod1* および *Nod2* は細菌のペプチドグリカン、*Nalp1* は炭疽菌の毒素を、*Nalp3* は細菌の RNA とペプチドグリカンを、*Nlrc4* と、本研究が着目した *Naip5* はフラジェリンを、それぞれ認識することが知られていた。しかし、これら *NLR* が、そのリガンドを「どのように」認識しているかについては、まったくわかっていなかった。

2. 研究の目的

レジオネラがマクロファージ細胞内で「どのように」宿主に認識されるかは未知である。本研究は、レジオネラが、宿主の *Naip5* 蛋白質を中心とした複合体 (*Naip5* 複合体) に認識されているとの仮説を立て、それを証明する。そのために、「*Naip5* 複合体」を精製・単離するための細胞株を作製し、それをもちいて「*Naip* 複合体」を精製する。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス由来の *Naip5* cDNA をクローニングし、そのコード領域を、プロモーター、GFP 配列、G418 耐性遺伝子を含む市販の発現ベクターに連結した。これを線状化してエレクトロポレーションで RAW264 細胞に

導入後、G418 で選択し、GFP-*Naip5* 融合遺伝子が染色体に組み込まれて、高レベルかつ安定に発現するクローンを選別した。選別したクローンについて、レジオネラ感染に対する応答を確認した。すなわち、レジオネラ感染細胞におけるカスパーゼ 1 の活性化、細胞死、および細胞内増殖の阻害の有無を検討した。カスパーゼ 1 の活性化は、*IL-1 β* の分泌量を ELISA で測定することにより数値化した。細胞死は、エチジウムホモダイマー 1 (EthD-1) の取り込み、および乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の放出を指標にした。細胞内のレジオネラ生菌数を測定する際には、感染細胞の破砕液を BCYE α にプレーティングし、出現したコロニー (cfu) を計測した。また、*Naip5* に結合する蛋白質は、免疫沈降にておこなった。

4. 研究成果

RAW264 マクロファージ細胞株で *Naip5* を高レベルに安定発現するクローン (RAW-*Naip5*) を得ることができた。そこで、RAW-*Naip5* をもちいてレジオネラ感染に対する応答を検討した。

RAW-*Naip5* では、レジオネラ感染時に EthD-1 の取り込みが増大することから、細胞死が起きることが明らかになった。レジオネラ感染細胞の死は LDH の放出量が増大することからも確かめられた。さらにこのとき、*IL-1 β* の分泌量が顕著に上昇し、カスパーゼ 1 が活性化されていることが明らかになった。また、レジオネラの細胞内増殖が阻害されることがわかった。このような応答は、フラジェリンを欠損したレジオネラを感染させた際には全く起きなかった。これらの結果から、本研究で作製した RAW-*Naip5* において、*Naip5* 蛋白質依存的にフラジェリンが認識されて pyroptosis が誘導され、菌の細胞内増殖の抑制に寄与していると考えられた。

そこで、*Naip5* とフラジェリンとの直接の結合の有無を検討した。293 細胞で *Naip5* とフラジェリン遺伝子 (*flaA*) を一過性に共発現させ、免疫沈降実験をおこなったところ、両者の結合は確認できなかった。このことから、レジオネラ感染マクロファージにおいて、*Naip5* はレジオネラのフラジェリンを直接結合して認識するのではなく、別の因子を介し

て認識することが示唆された。

他方, RAW-Naip5にIV型分泌装置を欠損するレジオネラを感染させた場合でも, カスパーゼ1の活性化と細胞死がみられなかった。このことから, 宿主のNaip5蛋白質が, 細胞内のレジオネラ由来のフラジェリンだけでなく, IV型分泌装置, あるいはIV型分泌装置で宿主の細胞内に輸送されるエフェクターをも認識していると考えられ, これらとカスパーゼ1からなる複合体が形成されていることが示唆された。このような, 細胞内のレジオネラを認識する「Naip5複合体」を単離するためのツールとして, 本研究で得たRAW-Naip5が有用であると考えられた。

ところで, Naip5のヒトホモログNAIPは, カスパーゼ3および7に結合してこれらの活性を阻害することでapoptosisを抑制する蛋白質として知られている。ヒトNAIPを安定発現するRAW264細胞を作製し (RAW-NAIP), レジオネラを感染させた。驚いたことに, RAW-NAIPはRAW-Naip5とほぼ同様の応答を示し, pyroptosisを促進することが明らかになった。このことから, ヒトNAIPもまたNaip5と同様にレジオネラの菌体成分を認識して宿主の応答を誘導し, ヒトのレジオネラ感染の際に防御的に機能していることが示唆された。

さらに, 感染とは別の細胞ストレスとして, カンプトテシンによりDNA傷害を誘起した際のapoptosisについて, Naip5およびヒトNAIPの作用について検討した。興味深いことに, ヒトNAIPのみならず, マウスNaip5もまた, DNA傷害によるapoptosisを抑制することが明らかになった。このとき, カスパーゼ3および7の活性化が阻害されていることがわかった。カスパーゼ1は, Naip5およびNAIPの発現の有無に関わらず活性化されなかった。

以上の結果から, マウスNaip5およびヒトNAIPは, マクロファージ内で生じたシグナルの種類に応じてカスパーゼの活性化を調節し, 細胞死を促進したり抑制したりする, 生存調節因子であることが明らかになった。

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7件)

1. Katagiri N, Shobuike T, Chang B, Kukita A, Miyamoto H. (2012) The human apoptosis inhibitor NAIP induces pyroptosis in macrophages infected with *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection*. in press. (査読有)
2. Nagata M, Ueda O, Shobuike T, Muratani T, Aoki Y, Miyamoto H. (2012) Emergence of Optochin Resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Japan. *Open Journal of Medical Microbiology*. 2, 8-15. (査読有)
3. Kukita A, Kukita T, Nagata K, Teramachi J, Li YJ, Yoshida H, Miyamoto H, Gay S, Pessler F, Shobuike T. (2011) The transcription factor FBI-1/OCZF/LRF is expressed in osteoclasts and regulates RANKL-induced osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis & Rheumatism*. 63(9), 2744-2754. (査読有)
4. 菫蒲池健夫, 宮本比呂志. (2011) 糖尿病による細菌感染の特徴. *内分泌・糖尿病・代謝内科*. 33 (1), 22-27. (総説)
5. 菫蒲池健夫, 宮本比呂志. (2011) レジオネラーIV型分泌機構—急性肺傷害. *呼吸器内科*. 19(1), 22-29. (総説)
6. Akiyama T, Miyamoto H, Fukuda K, Sano N, Katagiri N, Shobuike T, Kukita A, Yamashita Y, Taniguchi H, Goto M. (2010) Development of a novel PCR method to comprehensively analyze salivary bacterial flora and its application to patients with odontogenic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 109(5), 669-676. (査読有)
7. 菫蒲池健夫, 片桐菜々子, 宮本比呂志.

(2009) *Legionella pneumophila* の細胞内増殖制御機構—*Lgn1/Naip5/Birc1e* 遺伝子を中心に—. *日本細菌学雑誌*. 64(2-4), 319-330. (総説)

[学会発表] (計 5 件)

1. 片桐菜々子, 菫蒲池健夫, 宮本比呂志. The human apoptosis inhibitor NAIP induces pyroptosis in macrophages infected with *Legionella pneumophila*. 第 85 回日本細菌学会総会. 2012 年 3 月 27-29 日. 長崎.
2. Katagiri N, Shobuike T, Miyamoto H. Human NAIP restricts *Legionella pneumophila* replication accompanied by host cell death. 13th International Union of Microbiological Sciences Congress. 2011 年 9 月 6-10 日. Sapporo.
3. 片桐菜々子, 菫蒲池健夫, 宮本比呂志. Human NAIP restricts *Legionella pneumophila* replication accompanied by host cell death. 第 84 回日本細菌学会総会. 2011 年 9 月 6-10 日. 札幌.
4. 片桐菜々子, 菫蒲池健夫, 宮本比呂志. ヒト NAIP はレジオネラ感染の際に細胞死を誘導する. 第 63 回日本細菌学会九州支部総会. 2010 年 9 月 3-4 日. 宮崎.
5. 片桐菜々子, 菫蒲池健夫, 宮本比呂志. ヒト NAIP によるレジオネラの細胞内増殖の抑制. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27-29 日. 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菫蒲池 健夫 (SHOBUIKE TAKEO)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 70336113

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :