

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 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790405

研究課題名（和文）感染細胞におけるリステリア主要病原因子依存的なインフラマソーム形成機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of virulence factor dependent-inflammasome activation upon *Listeria monocytogenes* infection

研究代表者

原 英樹 (HARA HIDEKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30456892

研究成果の概要（和文）：細菌感染においてインフラマソーム応答は、プログラム細胞死 pyroptosis や IL-1 β および IL-18 などのサイトカイン産生を誘導する宿主免疫応答である。我々の実験結果から、AIM2 がリステリア (*Listeria monocytogenes*) 感染で誘導されるインフラマソーム応答に関与していること、また Syk などのキナーゼシグナルや 1 型 IFN がその制御機構として働いていることが明らかとなった。一方、菌側の要因としてリステリアの主要病原因子 listeriolysin O の 204 番目から 254 番目のアミノ酸配列内にインフラマソーム活性化に関わる責任領域が含まれていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Inflammasome activation is responsible for the programmed cell death pyroptosis and cytokine production including IL-1 β and IL-18. Based on our results, it was clarified that AIM2, type I IFN and kinase signals such as Syk are involved in the inflammasome activation induced by *Listeria monocytogenes*. Furthermore, we narrowed down the responsible region of listeriolysin O for inflammasome activation as a bacterial factor and revealed that the amino acid region from 204 to 254 of listeriolysin O is important for the activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：感染免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) グラム陽性桿菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*) は、広範な細胞に侵入して細胞質内で増殖する代表的な細胞内寄生菌である。本菌は、マクロファージ系食細胞に貪食されても、主要病原因子である膜傷害性タンパク listeriolysin O (LLO) を

産生することで食胞膜を傷害し、細胞質へとエスケープして細胞内殺菌を回避する。本菌が宿主に感染すると免疫応答の 1 つとして感染防御に重要な IFN- γ が産生誘導される。感染初期に産生される IFN- γ は NK 細胞に由来しており、マクロファージから産生される IL-12 や IL-18 によって NK 細胞が活性

化されることで産生が惹起される。この IFN-gamma 誘導因子のうち、IL-18 はシステインプロテアーゼの1つである caspase-1 によって切断されることで成熟化するが、この caspase-1 自身もインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体の形成を介して活性化される必要がある。

(2) これまでに研究代表者は感染マクロファージにおいてリステリアが ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 依存的なインフラマソーム形成を惹起すること、また、その応答に LL0 が関与していることを報告した (Hara H, et al. *J. Immunol.* 2008)。しかしながら、そのインフラマソーム活性化に関わる菌および宿主の制御因子や誘導機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究は、感染マクロファージにおけるリステリアで誘導されるインフラマソーム活性化機構の解明、および主要病原因子である LL0 がどのようなメカニズムでインフラマソーム活性化に関与しているのか明確にする目的で行った。

3. 研究の方法

(1) インフラマソームは受容体分子、アダプター分子 ASC および caspase-1 前駆体から構成されるタンパク複合体であり、ASC の必要性は受容体分子が pyrin ドメインを有するかどうかで決定される。リステリア感染で誘導されるインフラマソーム応答は ASC を必要とすることから、その受容体分子は pyrin ドメインを有すると考えられた。そこで、受容体分子を同定するため、siRNA で候補となる細胞内分子の発現をノックダウンし、リステリア感染後の caspase-1 活性化および IL-18 産生に違いが出るか調べた。

(2) インフラマソーム形成は (1) で検討した受容体分子を介したシグナルの他に 1 型 IFN やキナーゼ、一酸化窒素といった様々なシグナルによって制御されていることが報告されている。そこで、リステリア感染で誘導されるインフラマソーム応答がどのような細胞内シグナル伝達機構でコントロールされているのか阻害剤や siRNA を用いて検討を行った。

(3) 研究代表者はリステリアの主要病原因子である LL0 がインフラマソーム活性化に関与していること、また LL0 類縁体の ivanolysin 0 (ILO) を相補したリステリアではその活性が有意に低下することを以前に報告した。そこで LL0 のどの分子領域がイ

ンフラマソーム活性化に関与しているのか調べるために、LL0 をコードする遺伝子の一部を ilo 遺伝子に置き換えたキメラ株を作製し、マクロファージに感染後、インフラマソームの活性化に変化があるか調べた。

4. 研究成果

(1) リステリアは ASC 依存的にインフラマソームを活性化することから、マウスマクロファージに発現が確認されている pyrin ドメインを有する細胞内分子に焦点を絞りスクリーニングを行った。その結果、DNA センサーとしての機能が報告されている AIM2 (absent in melanoma 2) を siRNA でノックダウンした場合にリステリア感染で誘導される caspase-1 活性化が顕著に低下した (図 1)。また、この結果から細胞内寄生菌であるリステリア由来の DNA が宿主細胞内で認識されている可能性が示唆された。

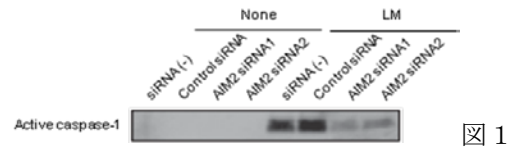


図 1

(2) リステリア感染で誘導されるインフラマソームの活性化がどのようなシグナルで制御を受けるか検討した。AIM2 は 1 型 IFN の影響を受けることが知られているので、1 型 IFN 受容体欠損マウスからマクロファージを回収し、野生型細胞と比較した。その結果、インフラマソーム依存的なサイトカインである IL-18 産生が欠損細胞では部分的ではあるが減弱した (図 2)。さらにキナーゼ阻害剤を用いた検討から、Syk を阻害するとリステリア感染で誘導される IL-18 産生が著明に低下した (図 3)。これらの結果から、その詳細な機序は不明であるが、複数の細胞内シグナルによってリステリア依存的なインフラマソーム応答が制御されていることが示唆された。

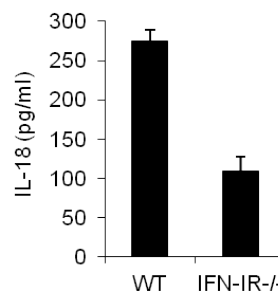


図 2

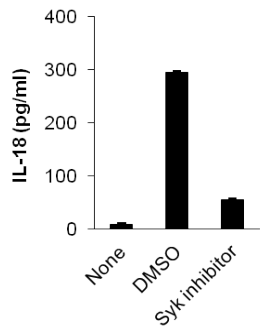


図 3

(3) 感染マクロファージでのインフラマソーム応答に関わる菌側の因子として LLO が関与していることを研究代表者は報告している。一方で *L. ivanovii* 由来の ILO にはそのような活性が認められないことから、LLO 特有の分子構造がインフラマソーム応答を亢進している可能性が考えられた。そこで同活性に必要な LLO の責任領域を絞り込むために、4 つのドメインから構成される LLO の一部を ILO に置換した 7 種のキメラ株を作製した(図 4)。その結果、ドメイン 3 に含まれる 204 番目から 254 番目のアミノ酸領域を ILO に置き換えた場合に IL-18 産生応答が有意に低下することから、この領域が感染細胞内で認識されている可能性が示唆された(図 5)。

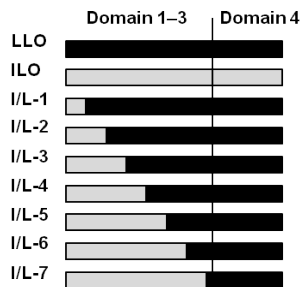


図 4

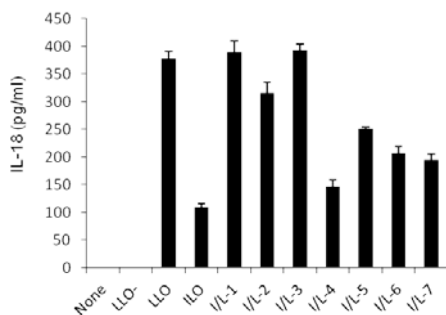


図 5

以上の結果から、リステリアが感染マクロファージ内で AIM2 を受容体としたインフラ

マソームを形成誘導していることが証明され、1 型 IFN や Syk などを経た細胞内シグナルがインフラマソーム活性化に必要であることが判明した。一方で、リステリアの需要病原因子である LLO の 204 番目から 254 番目のアミノ酸配列がこのインフラマソーム応答の亢進に関わっていることが明らかとなった。今後、これらインフラマソーム制御に関わる細胞内シグナルの活性化への LLO の影響を検討する。

(4) 細菌感染モデルにおいて、細菌の主要病原因子が宿主免疫応答の誘導にも関与しているという報告は世界で初めてであり、今回の研究の発端となった研究代表者の最初の報告は米国細菌学会誌でもハイライトとして取り上げられている (Microbe, Sep. 2007)。この研究で用いているリステリアは細胞内寄生を特徴とし、極めて強い T 細胞依存的な防御免疫を宿主に賦与することから、近年、ワクチンや遺伝子治療のベクターとしての利用が注目されている。LLO の免疫誘導活性の詳細な分子機構が解明されれば、より効率的かつ安全なワクチン・遺伝子治療用ベクターの開発にとって有用な知見となることが期待される。

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 7 件)

1. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood*. 査読有. 119. 2012. 434-444. URL <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/119/2/434.long>
2. Fang R, Tsuchiya K, Kawamura I, Shen Y, Hara H, Sakai S, Yamamoto T, Fernandes-Alnemri T, Yang R, Hernandez-Cuellar E, Dewamitta SR, Xu Y, Qu H, Alnemri ES, Mitsuyama M. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *The Journal of Immunology*. 査読有. 187. 2011. 4890-4899. URL <http://www.jimmunol.org/content/187/9/4890.long>
3. Daim S, Kawamura I, Tsuchiya K, Hara H, Kurenuma T, Shen Y, Dewamitta SR, Sakai

- S, Nomura T, Qu H, Mitsuyama M. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages. *Journal of Medical Microbiology*. 査読有. 60. 2011. 582-591. URL <http://jmm.sgmjournals.org/content/60/5/582.full>
4. Nagahama M, Itohayashi Y, Hara H, Higashihara M, Fukatani Y, Takagishi T, Oda M, Kobayashi K, Nakagawa I, Sakurai J. Cellular vacuolation induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *FEBS Journal*. 査読有. 278. 2011. 3395-3407. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08263.x.
5. Tsuchiya K, Hara H, Kawamura I, Nomura T, Yamamoto T, Daim S, Dewamitta SR, Shen Y, Fang R, Mitsuyama M. Involvement of absent in melanoma 2 in inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology*. 査読有. 185. 2010. 1186-1195. URL <http://www.jimmunol.org/content/185/2/1186.long>
6. Shen Y, Kawamura I, Nomura T, Tsuchiya K, Hara H, Dewamitta SR, Sakai S, Qu H, Daim S, Yamamoto T, Mitsuyama M. Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages. *Infection and Immunity*. 査読有. 78. 2010. 2857-2867. URL <http://iai.asm.org/content/78/6/2857.long>
7. Dewamitta SR, Nomura T, Kawamura I, Hara H, Tsuchiya K, Kurenuma T, Shen Y, Daim S, Yamamoto T, Qu H, Sakai S, Xu Y, Mitsuyama M. Listeriolysin O-dependent bacterial entry into cytoplasm is required for calpain activation and IL-1alpha secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 査読有. 78. 2010. 1884-1894. 2010. URL <http://iai.asm.org/content/78/5/1884.long>
- [学会発表] (計6件)
1. Hara H. Analysis of the region responsible for inflammasome activation in listeriolysin O. 第85回 日本細菌学会総会. 2012年3月27日. 長崎.
 2. Hara H. Involvement of listeriolysin O-mediated inflammasome activation in bacterial virulence upon *Listeria monocytogenes* infection. 第40回 日本免疫学会学術集会. 2011年11月28日. 幕張.
 3. 原 英樹. リステリア感染における主要病原因子 listeriolysin O のインフラマソーム形成を介した病原性への関与. 第64回 日本細菌学会関西支部総会. 2011年11月19日. 大阪.
 4. Hara H. Participation of inflammasome activation mediated by listeriolysin O in bacterial virulence upon *Listeria monocytogenes* infection. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011年9月8日. Sapporo.
 5. Hara H. Involvement of type I interferon in inflammasome formation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. 14th International Congress of Immunology. 2010年8月22日. Kobe.
 6. 原 英樹. リステリア感染で誘導される caspase-1 活性化における listeriolysin O の重要性. 第57回トキシシンポジウム. 2010年7月14日. 長浜.
- [その他]
ホームページ
http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1204/
6. 研究組織
(1) 研究代表者
原 英樹 (HARA HIDEKI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：30456892