

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：13802
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790473
 研究課題名（和文）イメージ解析とプロテオミクスによる結核菌ファゴソームにおける小胞輸送の包括的解析
 研究課題名（英文）Comprehensive analysis of membrane trafficking on Mycobacterium tuberculosis-containing phagosomes by imaging and proteomics analyses
 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

研究成果の概要（和文）：

結核菌は典型的な細胞内寄生性細菌である。結核菌はヒトの肺に感染すると、肺胞マクロファージによって貪食されるが、貪食されたマクロファージ内で増殖することができる。この細胞内増殖能は結核菌によるファゴリソーム形成阻害機構に依存していると言われている。これまでの研究では、Coronin 1a が、結核菌ファゴソームに局在することによって、ファゴリソーム形成の阻害が行われていることが示されている。Coronin-1a ノックアウトマウス由来マクロファージやノックダウンマクロファージにおいて、結核菌ファゴソームとリソソームの融合が促進されて、その結果、結核菌の増殖は阻害されることが示されている。しかし、Coronin-1a による結核菌ファゴソームのファゴリソーム形成阻害機構の詳細はいまだ明らかになっていない。本研究において、Coronin-1a ノックダウンマクロファージに感染した結核菌ファゴソームにオートファゴソーム形成が行われていることを明らかにした。さらに、結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成機構の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Mycobacterium tuberculosis is an intracellular bacterium that can survive within macrophages. Such survival is potentially associated with Coronin-1a. We investigated the mechanism by which Coronin-1a promotes the survival of *M. tuberculosis* in macrophages and found that autophagy was involved in the inhibition of mycobacterial survival in Corola knockdown macrophages. Fluorescence microscopy and immunoblot analyses revealed that LC3, a representative autophagic protein, was recruited to *M. tuberculosis*-containing phagosomes in Corola knockdown macrophages. Thin-section electron microscopy demonstrated that bacilli were surrounded by the multiple membrane structures in Corola knockdown macrophages. These results demonstrate the formation of autophagosomes around *M. tuberculosis* in Corola knockdown macrophages. LC3 recruitment to *M. tuberculosis*-containing phagosomes was also observed in Coronin-1a knockdown alveolar or bone marrow derived macrophages. These results suggest that Coronin-1a inhibits autophagosome formation in alveolar macrophages, thereby facilitating *M. tuberculosis* survival within the lung.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：結核菌、マクロファージ、オートファジー、イメージ解析、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

結核菌は細胞内寄生性細菌である。結核菌は感染マクロファージ内においてファゴソームとリソソームの融合（ファゴリソソーム形成）を阻害することによって、増殖能を獲得している。これまでに、ファゴソーム成熟に機能する Rab GTPase が結核菌ファゴソームからかい離することによってファゴソーム成熟が阻害され、その結果、結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成が阻害されることを明らかにした。結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成阻害機構として、ファゴソーム成熟に関与する Rab GTPase のかい離機構のほかに、アクチン結合性タンパク質である Coronin 1a によるファゴリソソーム形成阻害機構が示されている。すなわち、Coronin-1a ノックアウトマウス由来マクロファージやノックダウンマクロファージにおいて、結核菌ファゴソームとリソソームの融合が促進されて、その結果、結核菌の増殖は阻害されることが示されている。しかし、Coronin-1a による結核菌ファゴリソソーム形成阻害における分子機構はいまだ明らかになっていない。近年、マクロファージによる結核菌の殺菌機構として、オートファジーが注目されている。オートファジーは、細胞が飢餓状態になった場合や損傷を受けたときに誘導される、細胞の恒常性維持に機能するタンパク質分解過程である。また、免疫機構において、抗原提示細胞が抗原を効率よく分解、提示するためにオートファジーを利用することが明らかになっている。特に自然免疫機構における感染細胞の細胞質に移行する細胞内寄生性細菌の排除にオートファジーが機能していることが明らかになっている。Coronin-1a による結核菌殺菌阻害機構を研究している過程で、Coronin-1a ノックダウンマクロファージでは結核菌ファゴソームにオートファゴソーム形成が誘導されることを明らかにした。本研究では Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成機構の解析を行った。

2. 研究の目的

結核菌感染マクロファージにおける Coronin-1a のオートファゴソーム形成阻害機構を明らかにするために、Coronin-1a ノックダウンマクロファージに結核菌を感染させて、イメージ解析およびプロテオミクス解析によって、オートファゴソーム形成機構の詳細を解明する。

3. 研究の方法

(1) Coronin-1a ノックダウン

Coronin-1a siRNA を Raw264.7 マクロファ

ージに Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入することによって Coronin-1a ノックダウンマクロファージを調整した。Coronin-1a、Atg3、Atg5、Beclin1、ネガティブコントロール siRNA はシグマアルドリッチで合成した。

(2) 蛍光顕微鏡法

結核菌 Erdman 株を感染させたマクロファージをパラフォルムアルデヒドで固定した後、抗 LC3 抗体で免疫染色を行った。細胞観察は 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) 結核菌ファゴソーム画分の調整

Raw264.7 マクロファージに結核菌を貪食させたのち Beatty et al (Cell Microbiol. 2002; (4) 167-76) の方法に従ってファゴソーム画分を単離した。すなわち、結核菌を Raw264.7 マクロファージに 6 時間貪食させて、細胞を回収した。ファゴソーム膜を破壊しないように細胞を破碎した。感染マクロファージ破碎液をショ糖密度勾配遠心分離法、およびフィコール重層遠心分離法を行った。沈殿画分を PBS で洗浄後、結核菌ファゴソーム画分とした。

4. 研究成果

(1) Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける感染結核菌の増殖とファゴリソソーム形成

Coronin-1a ノックダウンマクロファージに結核菌を感染させて、感染 3 日後における結核菌数を測定した。その結果、Coronin-1a ノックダウンマクロファージではコントロールマクロファージと比べて感染結核菌の増殖は阻害された。しかし、Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける結核菌ファゴソームはリソソームとは融合していないことを蛍光デキストランでリソソームをラベルしたマクロファージや抗カテプシン D 抗体による免疫染色によって明らかにした。これは、Coronin-1a ノックダウンマクロファージでは結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成は促進されないことを示す。

(2) Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける結核菌増殖阻害とオートファジー誘導

Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける結核菌増殖阻害機構を明らかにするために、オートファジー誘導と結核菌増殖との関係を調べた。Coronin-1a ノックダウンマクロファージをオートファジー誘導阻害剤である wortmannin や 3-メチルアデニン (3-MA) で処理した場合、結核菌増殖阻害は起こらなかった。また、オートファジー関連遺伝子である Atg3、Atg5、Beclin1 を

Coronin-1a と同時にノックダウンした場合でも結核菌増殖阻害は起こらなかった。このことは、Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける結核菌増殖阻害機構にオートファジー誘導機構が関与していることを示す。

(3) 結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成

Coronin-1a ノックダウンマクロファージ感染結核菌ファゴソームにおけるオートファゴソーム形成過程を明らかにした。結核菌感染マクロファージを固定して、オートファジーマーカーである LC3 の局在を調べた。コントロールマクロファージでは LC3 は結核菌ファゴソームに局在しなかった。Coronin-1a ノックダウンマクロファージでは感染 6 時間後に LC3 が局在する結核菌ファゴソーム数が増加した。また、電子顕微鏡法によっても、結核菌ファゴソームの周りにオートファジー誘導に特異的な膜構造が局在していることが明らかになった。このことは、Coronin-1a ノックダウンマクロファージでは感染結核菌にオートファゴソーム形成を行うことを示す。

(4) 結核菌ファゴソームにおける LC3 の局在次に、結核菌ファゴソームにおける LC3 の局在を生化学的に解析した。結核菌ファゴソームを生化学的に単離して、SDS-PAGE の後に抗 LC3 抗体でウェスタン解析を行った。Coronin-1a ノックダウンマクロファージから単離した結核菌ファゴソームにはコントロールに比べて 2 倍以上の LC3 が局在していることが明らかになった。また、オートファジー誘導阻害剤である wortmannin や 3-MA 処理、オートファジー関連遺伝子である Atg3、Atg5、Beclin1 に対するノックダウンは Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成を減少させることを蛍光顕微鏡法によって明らかにした。

(5) 結核菌オートファゴソーム成熟機構

Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける結核菌オートファゴソーム成熟機構について明らかにした。LC3 陽性結核菌に局在するオートファジーアダプタータンパク質である p62 やユビキチンの局在を免疫蛍光顕微鏡法で調べた。感染 6 時間後には約 40% の LC3 陽性結核菌ファゴソームに p62 やユビキチンが局在していたが、感染 24 時間後において増加していた。このことは感染時間の経過と共に結核菌オートファゴソーム成熟が進行していることを示す。また、リソソームマーカータンパク質である LAMP1 の局在についても明らかにした。感染 6 時間後において LAMP1 が局在している LC3 陽性結核菌ファゴソームは約 20%であったが、感染 24 時間後において 40%まで増加した。以上

の結果は、Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける

(6) 結核菌肺胞マクロファージにおけるオートファジー誘導

肺胞マクロファージ細胞株である MH-S や骨髄由来マクロファージに結核菌を感染させた。コントロールマクロファージでは結核菌ファゴソームに LC3 は局在しなかったが、Coronin-1a ノックダウンマクロファージでは結核菌ファゴソームに LC3 が局在した。このことは肺胞マクロファージや骨髄由来マクロファージでも Coronin-1a をノックダウンすることによって感染結核菌にオートファゴソーム形成を誘導することを示す。

(7) 考察

これまでの研究では、Coronin-1a は結核菌ファゴソームに局在することによって、ファゴリソソーム形成の阻害が行われていることが示されていた。すなわち、Coronin-1a は結核菌ファゴソームに局在することによる物理的障壁として、さらに、Coronin-1a はカルシニューリンの活性化を行うことによって、結核菌ファゴソームとリソソームの誘導を阻害することが示されていた。しかし、本研究では Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおいて、結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成は促進されないが、感染結核菌の増殖は阻害されることを明らかにした。さらに本研究によって、Coronin-1a ノックダウンマクロファージにおける結核菌増殖阻害には感染結核菌のオートファゴソーム形成が関与することが明らかになった。結核菌はファゴソームにとどまる細胞内寄生性細菌であると考えられてきた。しかし、近年の研究成果によって、感染後期においてファゴソームから細胞質へ移行することが明らかになっている。また、結核菌病原因子である ESAT-6 は細胞膜障害活性を有していることが報告されている。結核菌は Coronin-1a ノックダウンマクロファージではファゴソーム膜を溶解して、細胞質に移行する。その結果、細胞質内でオートファゴソーム形成が行われていることが示唆される。

(8) 結論

アクチン結合性タンパク質である Coronin-1a はマクロファージに感染した結核菌へのオートファゴソーム形成を阻害することを明らかにした。また、Coronin-1a はオートファゴソーム形成を阻害するため、感染結核菌の細胞内増殖を促進す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 6 件)

- (1) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2012. アクチン結合タンパク質 Coronin-1a によるオートファゴソーム形成の抑制と結核菌のマクロファージにおける生存. 生体の科学. 494-495: 64-9.
- (2) Seto S, Tsujimura K, Koide Y. 2012. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. Cell Microbiol. 14:710-7
- (3) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌の細胞内寄生メカニズム. 日本臨床. 69: 1373-7
- (4) Sugaya K, Seto S, Tsujimura K, Koide Y. 2011. Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. Biochem Biophys Res Commun. 410:371-375.
- (5) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌ファゴソームの成熟阻害機構. 化学療法領域. 27: 64-69.
- (6) Seto S, Tsujimura K, Koide Y. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. Traffic. 12:407-420.

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫. p62 mediates autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis* in dendritic cells. 第 86 回日本細菌学会総 2013 年 3 月
- (2) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. Coronin-1a inhibits the autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes 第 85 回日本細菌学会総 2012 年 3 月
- (3) Seto S, Tsujimura K, Koide Y. Image analysis reveals that *Mycobacterium tuberculosis* mediates the differential recruitment of Rab GTPases to its phagosomes during arresting phagosome

maturation.国際微生物学会連合 2011 会議シンポジウム 2011 年 9 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし