

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870880

研究課題名(和文) 抗感染症薬開発に向けた感染共通因子の探索

研究課題名(英文) The exploration of common factor for infection to develop anti-microbe agent

研究代表者

半田 浩 (Yutaka, Handa)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：30707451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌が宿主への感染を成立させるためには宿主との相互作用が必須であることに着目し、宿主因子を標的とした抗菌薬の開発を目的に探索を行った。

宿主因子探索のためRNAi法でノックダウンした細胞にリステリアを感染させ、リステリア感染成立に必須である宿主因子の探索を行った。その結果、細胞骨格制御に関与している宿主因子がリステリアの感染成立に重要であることを明らかとした。さらに、他の病原細菌であるサルモネラや腸管病原性大腸菌にも関与していることを示唆する結果を得た。これらの結果から、同定した宿主因子は広範囲の細菌感染成立に深く関与しており、抗菌薬の標的因子の有効な候補になると推測される。

研究成果の概要(英文)：To develop anti-bacteria drug, I tried to identify common factor(s) that various pathogenic bacteria are essential for infection. To do this, I use Listeria infection model and shRNA for knockdown of host factors. shRNA expressing HeLa cells were infected with Listeria monocytogenes for plaque assay. By measuring a size of plaques and counting a number of plaques, I decided that several host factors, which are associated with the cytoskeleton rearrangement, are involved in Listeria infection. Surprisingly, identified host factors are important for other pathogenic bacteria such as Salmonella, Enteropathogenic Escherichia coli. These results strongly suggest that host factors identified in this study become convincing candidate for anti-bacteria drug.

研究分野：細菌感染

キーワード：細菌感染 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

ペニシリンの発見により始まった抗菌薬の開発・発展により先進国における細菌感染の死亡率は著しく減少した。しかしながら、開発途上国において、感染症は未だ死因の1位であり、先進国においても多剤耐性菌の出現・拡散により感染症の脅威は高まっている。近年行われた主要国首脳会議においても耐性菌の問題が取り上げられており、耐性菌への対策は急務である。しかし、既存の抗菌薬を改良した新薬を開発しても、病原体は速やかに耐性を得ることから、これまでとは異なる作用機序を持つ新規薬剤の開発が必須である。このため、病原体と宿主との相互作用の理解に立脚した感染機構の解明は極めて重要な知見を提供すると考えられる。

申請者は細菌感染の成立に関与している宿主因子として低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーに着目した。低分子量 G タンパク質は分子量が 2 ~ 3 万 Da 程度であり、GDP・GTP 結合活性と GTPase 活性を保有している。低分子量 G タンパク質には GTP 結合型(活性型)と GDP 結合型(不活性型)が存在しており、GDP 結合型から GTP 結合型への変換はグアニンヌクレオチド交換因子(GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor)により促進され、GTP 結合型から GDP 結合型への変換は GTPase 活性化タンパク質(GAP : GTPase Activating Protein)により制御されている。GTP 結合型はエフェクターと呼ばれる特定のタンパク質と結合することで上流からのシグナルを下流へ伝える“スイッチ”の役割を果たしている。

低分子量 G タンパク質は、一次構造の類似性から 5 つのファミリーに分かれており、このうち Rho ファミリーは哺乳類に 2 2 種類存在している。全 2 2 種類のうち主に Rac1, Cdc42, RhoA の研究が行われており、細胞骨格制御を中心として細胞極性・細胞接着・細胞周期・免疫応答など広範囲な細胞機構の制御に深く関与していることが知られている。Rac1 は WAVE 複合体と結合することで Arp2/3 複合体によるアクチン重合を促進させラメリポディアの形成を促す。Cdc42 は N-WASP と結合し、Rac1 同様 Arp2/3 複合体を活性化させフィロポディアを形成する。RhoA は ROCK、mDia と結合することでアクチン重合を促進しアクチンストレスファイバー形成を誘導する。Rac1、Cdc42、RhoA 以外の他の 19 種類の Rho ファミリータンパク質は近年になり徐々にではあるが着目されはじめ、機能が明らかにされつつある。RhoD は細胞内輸送・細胞突起誘導を制御し、RhoE は RhoA と競合することでアクチンストレスファイバー消失を促進する。RhoF/Rif は mDia2 と結合しフィロポディアを形成する。さらに RhoJ は細胞接着に関わっていることが報告されている。

感染症と Rho ファミリーの関わりは Rac1、Cdc42、RhoA による細胞骨格制御を中心に

理解されており、サルモネラ、赤痢菌、腸管病原性大腸菌(EPEC : Enteropathogenic E. coli)、腸管出血性大腸菌(EHEC : Enterohemorrhagic E. coli)、結核菌、緑膿菌、リケッチア、ピブリオ、リステリアなど多くの病原細菌が Rac1、Cdc42、RhoA を制御することで宿主細胞への感染を成立させることが報告されているが、他の 19 種類の Rho ファミリーと感染症の関わりはほとんど不明な状況である。

2. 研究の目的

本研究の目的は宿主因子を標的とした新規抗菌薬の開発を目標として、広範囲の病原細菌感染成立に関与している宿主因子を同定することである。既存の抗菌薬は細菌を標的とするために耐性菌の出現や耐性遺伝子の伝播が起きやすいが、宿主因子を標的とした抗菌薬は細菌への影響がないことから耐性菌の出現は極めて低いと予測される。さらに、近年になり着目されている腸管細菌叢など宿主に有益な細菌への影響もないことから抗菌薬投与において問題となっている偽膜性腸炎なども起きないと推測されることから宿主因子を標的とした抗菌薬は非常に有効であると考えられる。

3. 研究の方法

広範囲の病原体の感染成立に関与している宿主因子の探索を行うため、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーに焦点をあて検討を行った。スクリーニングはグラム陽性桿菌であるリステリアを用いた。リステリアは宿主細胞への侵入後、菌周辺にアクチン重合を誘導し、アクチンの駆動力を利用して隣接細胞へ感染し、感染拡大してプラークを形成する。一般的に病原体の感染成立には、侵入/付着・増殖・拡散の 3 段階があるが、プラークアッセイは上記 3 段階を包括的に評価できる実験系でありスクリーニングを容易にすることができた。

RNAi 法により全 2 2 種類の Rho ファミリータンパク質ノックダウン細胞株を構築するためにレンチウイルスベクターを用いて shRNA 安定発現細胞株を樹立した。ノックダウンの確認には各種抗体を用いてのウエスタンブロット法もしくは qPCR にて行った。

樹立した各種 Rho ファミリータンパク質ノックダウン細胞にリステリア(*Listeria monocytogenes*)を感染させ、感染 4 8 時間後のプラーク数とプラークサイズを測定した。プラーク数はリステリアの宿主細胞侵入効率を、プラークサイズは細胞内増殖、アクチンテイル形成能をそれぞれ評価した。

スクリーニングにてリステリアのプラーク数もしくはプラークサイズに変化が認められた Rho ファミリーは異なる実験系をもちいて宿主細胞侵入効率、そして細胞内増殖・拡散の検討を行った。宿主細胞侵入効率は免疫蛍光染色にて行った。同定された Rho ファ

ミリーノックダウン HeLa 細胞にリステリアを感染させ感染 10 分後に細胞を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて固定した。その後、抗リステリア抗体を用いて宿主細胞外に存在するリステリアと宿主細胞内に存在するリステリアを異なる蛍光色素で染色した。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、宿主細胞への侵入効率を評価した。細胞内増殖の評価にはゲンタマイシンプロテクションアッセイを用いた。Rho ファミリーをノックダウンした HeLa 細胞にリステリアを感染させ、感染 30 分後に培地をゲンタマイシン含有培地に置換することにより細胞外のリステリアを除去する。その後、経時的に界面活性剤により細胞を破碎して、細胞内の菌数を評価した。細胞内拡散の評価はアクチンテイル形成効率を比較した。Rho ファミリーをノックダウンした HeLa 細胞にリステリアを感染させ、感染 30 分後にゲンタマイシン含有培地に置換し、細胞外のリステリアを除去した。感染 4、6 時間後に細胞を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて固定し、抗リステリア抗体でリステリアを、ファロイジンにより F-アクチンをそれぞれ染色し、共焦点レーザー顕微鏡にてアクチンテイル形成効率を評価した。

サルモネラの宿主細胞侵入効率は免疫蛍光染色にて行った。リステリア感染に関与していると同定された Rho ファミリーノックダウン HeLa 細胞にネズミチフス菌 (*Salmonella enterica serovar Typhimurium* SL1344 株) を感染させ、感染 10 分後に 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて細胞を固定した。その後、抗 *Salmonella* LPS 抗体を用いて宿主細胞外と宿主細胞内に存在するネズミチフス菌を異なる蛍光色素で染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察することで宿主細胞侵入効率を評価した。ラッフル膜形成能を評価するために Rho ファミリーノックダウン HeLa 細胞にネズミチフス菌を感染させ、感染 10 分後に 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて細胞を固定した。固定した細胞は抗 *Salmonella* LPS 抗体にてネズミチフス菌を、ファロイジンにて F-アクチンを染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。EPEC の台座様構造形成を評価するため、Rho ファミリーノックダウン HeLa 細胞に EPEC を感染させ感染 2 時間後に 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて細胞を固定した。固定した細胞は抗 *E. coli* LPS 抗体にて EPEC を、ファロイジンにて F-アクチンを染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察することで評価を行った。

4. 研究成果

細菌感染成立に関与している Rho ファミリーを同定するため、各種 Rho ファミリーをノックダウンした HeLa 細胞にリステリアを感染させ、プラークアッセイを行った。その結果、複数の Rho ファミリーノックダウン細胞

においてプラス数の減少とプラークサイズの変化が観察された。これらのうち、プラークサイズに影響のあった 2 つの Rho ファミリーに着目し、プラークサイズが変化するメカニズムの解析を行った。

プラーク形成には宿主細胞内における増殖、そしてアクチンテイル形成による細胞内拡散が深く関与している。本研究で同定された Rho ファミリーが、プラーク形成においてリステリアの細胞内増殖とアクチンテイル形成能どちらに関与しているか検討した。Rho ファミリーノックダウン HeLa 細胞にリステリアを感染させ、形成されたアクチンテイルを観察した結果、コントロールと比較して Rho ファミリーノックダウン細胞でのアクチンテイル形成効率に変化は認められなかった。

次に、同定された Rho ファミリーがリステリアの細胞内増殖に影響があるかを検討した。Rho ファミリーノックダウン細胞にリステリアを感染させ経時的に細胞内のリステリアの菌数を測定した結果、Rho ファミリーノックダウン細胞ではコントロールと比較して増殖の増加傾向が確認された。これらの結果から、Rho ファミリーはリステリア感染時にリステリアの細胞内増殖抑制もしくは殺菌に関与していると考えられる。リステリアは宿主細胞内に侵入後、ファゴソームに包まれるが、ファゴソームがリソソームと融合しファゴリソソームになる前にファゴソームから細胞質へと脱出しファゴリソソームによる殺菌を回避する。さらに、細胞質においてリステリアはオートファジーにより殺菌されることが報告されている。このことから今回同定された Rho ファミリータンパク質は宿主細胞内でファゴリソソーム形成もしくはオートファジー形成に関与していることが推測されることから、今後さらなる検討を行う予定である。

リステリアのプラークアッセイで同定された Rho ファミリータンパク質がリステリアだけでなく他の病原細菌においても感染成立に重要であるかを検討するためにグラム陰性桿菌で宿主細胞内寄生細菌であるサルモネラと宿主細胞外感染菌である EPEC を用いて検討を行った。サルモネラ感染の特徴として宿主細胞のアクチン重合を促進させラッフル膜形成を誘導し、取り込まれることで宿主細胞への侵入を果たすことから、同定された Rho ファミリーがサルモネラの宿主細胞侵入に影響しているかを観察した。その結果、同定された Rho ファミリーノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して侵入効率が有意に減少していた。さらに、アクチン重合によるラッフル膜形成を観察したところ、ノックダウンによりラッフル膜のサイズもコントロールと比較して縮小していた (図 1)。



図1. サルモネラ感染によるラッフル膜誘導
本研究で同定されたRhoファミリータンパク質のノックダウン細胞ではサルモネラ感染により誘導されるラッフル膜が縮小し、侵入効率が減少した

次に Rho ファミリータンパク質と EPEC 感染の関連について検討を行った。EPEC は宿主細胞感染時、宿主細胞内でアクチン重合を促進し台座様構造を形成することで強固な附着を果たすことから、同定された Rho ファミリーが EPEC 感染時における台座様構造に影響しているか検討を行った。その結果、Rho ファミリーノックダウン細胞における台座様構造形成効率率はコントロール細胞と比較して有意な差は認められなかった。しかし、EPEC を感染させた際、Rho ファミリーノックダウン細胞では細胞周縁にアクチン重合促進によるラッフル膜形成が認められた(図2)。EPEC 感染によるラッフル膜形成誘導はこれまでに報告されていないことから、今回同定された Rho ファミリーは EPEC 感染に何らかの影響を与えている可能性があること

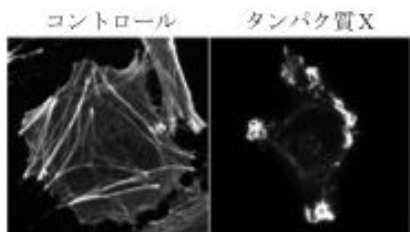


図2. EPEC感染による宿主細胞の細胞骨格再編成誘導
Rhoファミリーノックダウン細胞ではEPEC感染により細胞周縁にラッフル膜が誘導される

が判明した。

以上のことから、リステリア感染によるスクリーニングで同定された Rho ファミリータンパク質はサルモネラと EPEC の感染にも関与していることが明らかとなり、広範囲の細菌感染に重要な因子であることが示された。本研究において、これまで着目されていた Rac1, Cdc42, RhoA 以外の Rho ファミリータンパク質も細菌感染に深く関与していることが示された。今後は本研究で同定された Rho ファミリータンパク質が細菌感染において、いつ、どのように関与しているか検討を行い、細菌感染における Rho ファミリーの全容を明らかにし、新規抗菌薬の標的因子として研究開発を進めていきたい。

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 件)

〔学会発表〕(計 5件)

1. 半田浩
ワクシニアウイルス由来タンパク質 F11 は PDZ 様ドメインを介して Myosin-9A に結合することで RhoA シグナル伝達を抑制する
第 8 回細菌学若手コロッセウム
2014年8月6～8日
ホテルニセコいこいの村(北海道)

2. Yutaka Handa
An ITIM-bearing receptor Ly49Q regulates actin cytoskeleton by controlling Rac activity
第 4 3 回日本免疫学会学術集会
2014年12月10～12日
国立京都国際会館(京都)

3. 半田浩
サルモネラ感染における抑制性レセプター Ly49Q の機能解析
日本細菌学会関東支部インターラボセミナー
2015年8月6日
国立国際医療センター研究所(東京)

4. Yutaka Handa
A cis-interaction MHC class I receptor, Ly49Q mediated macropinocytic uptake of extracellular antigens
第 4 4 回日本免疫学会学術集会
2015年11月18～20日
札幌コンベンションセンター(北海道)

5. Yutaka Handa
Role of inhibitory receptor Ly49Q on SCV formation and inflammatory response triggered by Salmonella
第 8 9 回日本細菌学会総会
2016年3月23～25日
大阪国際交流センター(大阪)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

半田 浩 (HANDA, Yutaka)
国立研究開発法人国立国際医療研究セン
ター・その他部局等・上級研究員
研究者番号：30707451

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()