

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073009

研究課題名（和文） 細胞内寄生菌および抗酸菌の増殖と病原性

研究課題名（英文） Mechanism of growth and virulence expression in intracellular parasitic bacteria and mycobacteria

研究代表者 光山 正雄 (MITSUYAMA, MASAO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10117260

研究成果の概要（和文）：

細胞内寄生性を示すリステリア属細菌と抗酸菌のマクロファージ内増殖に関わる病原因子が感染宿主のサイトカイン応答を誘導する機序を解析した。リステリア属の膜傷害タンパクはカルパインやカスパーゼ1の活性化をマクロファージに誘導してIL-1 α 、IL-1 β 、IL-18などのサイトカイン成熟分泌を起こすこと、抗酸菌のRD1領域も同様の活性を示すことが明らかとなり、細胞内寄生に関わる病原因子が宿主サイトカイン応答に重要な役割を示すことを明確にした。

研究成果の概要（英文）：

This study was carried out to reveal how the virulence factors of *Listeria* and acid-fast bacteria, two representative intracellular parasitic bacteria, contribute to the host cytokine response. It was clearly shown that the activation of both calpain and caspase-1 in host macrophages is highly dependent on the major virulence factor, cytolysin and RD1 locus product of *Listeria* and *Mycobacteria*, respectively, resulting in the processing and secretion of IL-1 α , IL-1 β , and IL-18. The findings obtained in this study established the pivotal role of bacterial virulence factors for the induction of host cytokine response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	19,000,000	0	19,000,000
2007年度	19,000,000	0	19,000,000
2008年度	19,000,000	0	19,000,000
2009年度	19,000,000	0	19,000,000
2010年度	19,000,000	0	19,000,000
総計	95,000,000	0	95,000,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学 細菌学

キーワード：細胞内寄生菌、リステリア、結核菌

病原因子、マクロファージ、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

特定領域研究「感染のマトリックス」は、各種感染性病原体を縦系に、それぞれの増殖、病原性、宿主応答などの研究を横系として、

感染現象の分子論をマトリックス的に研究することを目的として発足した。そのうち、細胞内寄生性細菌は系統分類とは異なる特殊なカテゴリーであり、細胞内寄生、細胞内

殺菌からのエスケープ機構と、感染宿主における強い細胞性免疫応答が共通して認められる。本研究者は、細胞内寄生菌の代表ともいえるリステリアや結核菌の感染細胞内増殖に関わる病原因子につき、病原因子の機能を宿主応答、とくにサイトカイン産生応答との関連で解析を行った。

2. 研究の目的

リステリア (*Listeria monocytogenes*) および結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は通性細胞内寄生性を示し、マクロファージ内で殺菌に抵抗して生存する。その機序には複数の遺伝子が関与し、前者ではファゴソームから細胞質への脱出により、後者ではファゴソームから脱出はしないがその成熟を阻害して生存できる。従来、両菌種ともにその病原性が低下すると宿主のT細胞依存的獲得免疫の誘導能も低下することが知られており、病原因子が宿主免疫応答を誘導することが示唆されてきた。本研究の主要目的としては、それぞれの菌の候補病原因子がどのようにして宿主免疫応答を誘導に関わるかを、候補病原因子のリコンビナントタンパクの作製、候補病原因子遺伝子の欠損変異株の作製、および候補病原因子遺伝子を非病原株へ組み込み発現させた組換え株の作製などの手法を用いて探索した。免疫応答は主に *in vitro* での培養マクロファージへの感染により誘導される各種サイトカインを指標とし、一部にはマウスを用いた *in vivo* 感染実験も用いた。

本研究で宿主免疫応答に関わる菌側因子として解析の対象にした病原因子 (候補) は、リステリアの *LIP1* 領域に存在する遺伝子として *hly*, *actA* を、また結核菌の病原因子遺伝子候補として、*mce-1*, *PPE37*, および *RD1* 領域である。

3. 研究の方法

リコンビナントタンパクは、ゲノムよりPCRクローニングした候補遺伝子に6xHisのTagを付加して発現ベクターに組み込み、大腸菌にトランスフォームし培養した菌体から得たタンパクをNi-カラムで精製した。その上で混在するLPSを限界まで除去することによりリコンビナント標品とした。

変異株は常法により、目的とする候補遺伝子を *in frame* で欠落させた欠損変異株を作製した。また、完全欠損変異株の欠損部位に、本来存在すべき遺伝子の一部について、ドメイン欠損やアミノ酸置換を導入した遺伝子で相補した組換え株も作製した。

宿主応答をモニターする基本的実験として、マウス腹腔マクロファージを培養し、リコンビナントタンパク標品による刺激、または野生株および遺伝子欠損変異株、組換え株

を *in vitro* で感染させ、マクロファージが産生する各種サイトカインをEIAにより定量、また一部のプロセッシングを必要とするサイトカイン (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18) については、前駆体と成熟体をそれぞれウエスタンブロットで半定量的に測定した。一部実験では培養マクロファージ系細胞株 Raw264, 培養肺胞上皮細胞株 A549 を用いた。

研究の経過で新たに関与が示唆された宿主側因子を確定する目的で、caspase-1, ASC, NALP-3 などのノックアウトマウス、また免疫抑制受容体であるPD-1のノックアウトマウス由来のマクロファージを使用した。

4. 研究成果

[リステリアに関して]

- ① 病原リステリアである *L. monocytogenes* が細胞質内で産生する膜傷害タンパク LL0 は強いサイトカイン誘導活性を示し、とくに caspase-1 の活性化は domain1-3 に依存しており、膜傷害に関わる domain4 は、一旦食胞から脱出した後は必要としない。
- ② リステリア感染マクロファージでみられる caspase-1 の活性化は、ASC 依存的であるが、NALP3 への依存度が低いことが判明した。そこでインフラマソーム形成に関与する可能性のある細胞質内認識分子を網羅的に検索した結果、従来は知られていなかった AIM-2 が細胞質で細菌由来 DNA を認識し、インフラマソーム形成を起こすことが判明した。
- ③ 細胞質に脱出したリステリアは、Ca イオンの流入を促し、その結果カルパインが活性化され、IL-1 α のプロセッシングと分泌が起こる。
- ④ リステリア感染マクロファージへの菌の侵入 (食菌) には、TLR2 シグナルを介した PI3K および Rac1 の活性化が促進的に作用する。
- ⑤ LL0 が示す細胞傷害活性やマウスに対する心臓毒性は domain4 に依存し、また産生側の pH が必要であること、その機序として産生側 pH における domain4 の構造的安定化があることを見いだした。
- ⑥ LL0 標品が domain1-3 依存的に示すサイトカイン誘導活性はアジュバントとしての応用が可能で、マウスのアレルギー誘導モデルにおいて生体応答を Th1 へスキューさせることが可能であった。
- ⑦ LL0 と類似のタンパクを産生する肺炎球菌の感染でも、この菌が産生する PLY タンパクによる caspase-1 活性化がみられ、結果的に IL-1 β の成熟分泌が誘導される。

[結核菌、抗酸菌に関して]

- ① 機能不明の PE-PPE タンパクのうち、宿主細胞内で発現が亢進する PPE37 の機能を、弱

毒の *M. smegmatis* へ遺伝子導入した組換え株で解析した結果、このタンパクが宿主の炎症性サイトカイン応答を抑制することが判明した。

②重要な病原因子の候補として想定される RD1 領域の機能について、この領域の欠損変異株を用いて感染マクロファージへの影響をしらべた。その結果、RD1 領域産物がマクロファージからの K イオンの流出を促進し、おそらく NALP 3 依存的なインフラマソーム形成による caspase-1 活性化を起こすことが示された。

③RD1 領域の存在は感染細胞のミトコンドリア膜を傷害し、その結果としての ATP 産生の枯渇によつての細胞死（ネクローシス）に関与することが見出された（論文 14）。一方、caspase-9 が活性化されると細胞死に抑制的に作用することも見られた（論文 16）。最終的な宿主細胞死の程度は、これらのバランスによつて規定されていると考えられた。

④RD1 欠損変異株ではマクロファージからの IL-1 α 産生誘導能が低下するが、その機序として RD1 依存的な Ca イオン流入による calpain 活性化があることが見いだされた。

⑤マウスでは持続感染を起こす *M. bovis* BCG の感染で誘導される Th1 依存的獲得免疫の発現が、免疫成立後期に限弱する機序を探索し、宿主の PD-1/PD-L1 による抑制系シグナルの持続によつて起こることを見いだした（論文 5）。一方 PD-1 欠損マウスへの結核菌の感染では病態が改善することから、PD-1 経路を介した免疫抑制は、強毒株による感染では免疫応答による組織傷害を軽減する方向で働くことが示唆された。

⑥病原因子の候補として、結核菌が産生する侵入因子 Mce-1A に着目し、その感染細胞への影響をしらべた結果、ケモカイン産生を誘導する活性が見いだされた。

以上のように、リステリアおよび結核菌の各種病原因子が宿主マクロファージの各種サイトカイン応答を引き起こすことが明確に示された。とくに重要な知見は、LL0 依存的に細胞質に脱出するリステリアと、細胞質に脱出しない結核菌の双方に対して、マクロファージが caspase-1 や calpain を活性化して IL-1 β 、IL-18 や IL-1 α 産生するという事実であり、宿主マクロファージは細胞内寄生菌の病原因子を認識して、より強い炎症反応やマクロファージの活性化と、それに続く獲得免疫誘導を促進するという共通した応答を示すことが明らかとなった。

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〕（英文原著 計 22 件）

1. Daim, S., Kawamura, I., Tsuchiya, K., Hara, H., Kurenuma, T., Shen, Y., Dewamitta, S. R., Sakai, S., Nomura, T., Qu, H., and Mitsuyama, M. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low TNF- α and IL-6 production in murine macrophages. *J. Med. Microbiol.* (査読有り) 60: 582-591, 2011.
2. Shen, Y., Kawamura, I., Nomura, T., Tsuchiya, K., Hara, H., Dewamitta, S. R., Sakai, S., Qu, H., Daim, S., Yamamoto, T., and Mitsuyama, M. Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages. *Infect. Immun.* (査読有り) 78: 2857-2867, 2010.
3. Tsuchiya, K., Hara, H., Kawamura, I., Nomura, T., Yamamoto, T., Daim, S., Dewamitta, S. R., Shen, Y., Fang, R., and Mitsuyama, M. Involvement of absent in melanoma 2 in inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. (査読有り) 185: 1186-1195, 2010.
4. Sakai, S., Kawamura, I., Okazaki, T., Tsuchiya, K., Uchiyama, R., and Mitsuyama, M. PD-1-PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Int. Immunol.* (査読有り) 22: 915-925, 2010.
5. Dewamitta, S. R., Nomura, T., Kawamura, I., Hara, H., Tsuchiya, K., Kurenuma, T., Shen, Y., Daim, S., Yamamoto, T., Qu, H., Sakai, S., Xu, Y., and Mitsuyama, M. Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1 α secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* (査読有り) 78: 1884-1894, 2010.
6. Kurenuma, T., Kawamura, I., Hara, H., Uchiyama, R., Daim, S., Dewamitta, S. R., Sakai, S.,

- Tsuchiya, K., Nomura, T., and Mitsuyama, M. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages. (査読有り) Infect. Immun. 77: 3992-4001, 2009.
7. Hara, H., Tsuchiya, K., Nomura, T., Kawamura, I., Shoma, S., and Mitsuyama, M. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes* on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. J. Immunol. (査読有り) 180: 7859-7868, 2008.
 8. Shoma, S., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Nomura, T., Hara, H., Uchiyama, R., Daim, S., and Mitsuyama, M. Critical involvement of pneumolysin in production of IL-1 α and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. Infect. Immun. (査読有り) 76: 1547-1557, 2008.
 9. Kaku, T., Kawamura, I., Uchiyama, R., Kurenuma, T., and Mitsuyama, M. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. FEMS Microbiol. Lett. (査読有り) 274: 189-195, 2007.
 10. Hara, H., Ikuo Kawamura, Nomura, T., Tominaga, T., Tsuchiya, K., and Mitsuyama, M. Cytolysin-dependent escape of the bacterium from the phagosome is required but not sufficient for induction of the Th1 immune response against *Listeria monocytogenes* infection: distinct role of Listeriolysin O determined by cytolysin gene replacement. Infect. Immun. (査読有り) 75: 3791-3801, 2007.
 11. Uchiyama, R., Kawamura, I., Fujimura, T., Kawanishi, M., Tsuchiya, K., Tominaga, T., Kaku, T., Fukasawa, Y., Sakai, S., Nomura, T., and Mitsuyama, M. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. (査読有り) 75: 2894-2902, 2007.
 12. Kohiwattanagun, J., Kawamura, I., Fujimura, T., and Mitsuyama, M. Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. Microbiol. Immunol. (査読有り) 51: 253-261, 2007.
 13. Nomura, T., Kawamura, I., Kohda, C., Baba, H., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I., and Mitsuyama, M. Irreversible loss of membrane-binding activity of *Listeria*-derived cytolysins in non-acidic conditions: a distinct difference from allied cytolysins produced by other Gram-positive bacteria. Microbiology (査読有り) 153: 2250-2258, 2007.
 14. Watanabe, I., Nomura, T., Tominaga, T., Yamamoto, K., Kohda, C., Kawamura, I., and Mitsuyama, M. Dependence of the lethal effect of pore-forming haemolysins of Gram-positive bacteria on cytolytic activity. J. Med. Microbiol. (査読有り) 55: 505-510, 2006.
 15. Yamamoto, K., Kawamura, I., Tominaga, T., Nomura, T., Ito, J., and Mitsuyama, M. Listeriolysin O derived from *Listeria monocytogenes* inhibits the effector phase of an experimental allergic rhinitis induced by ovalbumin in mice. Clin. Exp. Immunol. (査読有り) 144: 475-484, 2006.
 16. Yamamoto, K., Kawamura, I., Ito, J., and Mitsuyama, M. Modification of allergic inflammation in murine model of rhinitis by different bacterial ligands: involvement of mast cells and dendritic cells. Clin. Exp. Allergy (査読有り) 36: 760-769, 2006.
- (上記の他 英文原著 6 件)
- [学会発表] (計 5 7 件)
1. 光山正雄 細胞内寄生性細菌の感染戦略と宿主の対応 第 42 回日本小児感染症学会総会 2010 年 11 月 27 日 仙台市仙台国際センター
 2. Hara, H., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Yamamoto, T., Nomura, T., and Mitsuyama, M. Involvement of type I interferon in inflammasome formation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. 14th International Congress of Immunology 2010 年 8 月 25 日 ICC

- Kobe, Japan.
3. Yamamoto, T., Hara, H., Tsuchiya, K., Sakai, S., Nomura, T., Kawamura, I., and Mitsuyama, M. The importance of Lmo2588/2589 in the ability of *Listeria monocytogenes* to induce IFN- β production. 14th International Congress of Immunology 2010年8月25日 ICC Kobe, Japan.
 4. Kawamura, I., Dewamitta, S. R., Nomura, T., Hara, H., Tsuchiya, K., Shen, Y., Daim, S., Yamamoto, T., Qu, H., Sakai, S., Xu, Y., and Mitsuyama, M. Listeriolysin O-dependent bacterial entry into cytoplasm is required for calpain activation and IL-1 α secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. 14th International Congress of Immunology 2010年8月25日 神戸国際展示場
 5. Sakai, S., Kawamura, I., Tsuchiya, K., Okazaki, T., and Mitsuyama, M. PD-1 inhibitory receptor prevents immunopathological responses in murine tuberculosis. 14th International Congress of Immunology 2010年8月25日 神戸国際展示場
 6. Mitsuyama, M. Listeriolysin O, a key factor of *Listeria monocytogenes* in the induction of immune response of the infected host. International Conference on Veterinary Immunology 2010. 2010年8月17日, Tokyo, Japan.
 7. 土屋晃介、原英樹、河村伊久雄、山本武司、Daim, S., Dewamitta, S. R., 申艶娜、方仁東、光山正雄 リステリア感染マクロファージにおけるインフラマソーム活性化機構 第21回日本生体防御学会 2010年7月22日仙台
 8. Tsuchiya, K., Hara, H., Nomura, T., Daim, S., Dewamitta, S. R., Kawamura, I., and Mitsuyama, M. Mechanism of inflammasome activation upon infection with *Listeria monocytogenes*. 第83回日本細菌学会 2010年3月27日 横浜
 9. Hara, H., Tsuchiya, K., Yamamoto, T., Kawamura, I., Nomura, T., and Mitsuyama, M. Listeriolysin O contributes to inflammasome formation through the phosphorylation of Syk. 第83回日本細菌学会 2010年3月27日 横浜
 10. Dewamitta, S. R., Sakai, S., Tsuchiya, K., Hara, H., Nomura, T., Kawamura, I., and Mitsuyama, M. Important role of ASC in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection in vivo. 第83回日本細菌学会 2010年3月28日 横浜
 11. Dewamitta, S. R., 野村卓正、原英樹、土屋晃介、暮沼武士、申艶娜、Daim, S., 酒井俊祐、屈慧新、山本武司、河村伊久雄、光山正雄 LLO-dependent entry of *Listeria monocytogenes* into cytoplasm is essential for calcium dependent calpain activation and IL-1 α secretion in infected macrophages. 第20回日本生体防御学会 2009年7月25日 東京
 12. Kawamura, I., Sakai, S., and Mitsuyama, M. PD-1-dependent signal impairs protective T cell response in chronic *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. The 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2009年7月29日 福岡
 13. Shen, Y., Nomura, T., Tsuchiya, K., Hara, H., Sakai, S., Qu, H., Daim, S., Dewamitta, S. R., Yamamoto, T., Kawamura, I., and Mitsuyama, M. TLR2-dependent signal is involved in the efficient phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by macrophages. 第39回日本免疫学会 2009年12月4日 大阪
 14. Hara, H., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Yamamoto, T., Nomura, T., and Mitsuyama, M. LLO participates in caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages via induction of IFN- β production. 第39回日本免疫学会 2009年12月4日 大阪
 15. Nomura, T., Dewamitta, S. R., Hara, H., Tsuchiya, K., Kawamura, I., and Mitsuyama, M. Bacterial cytoplasmic entry -inducing intracellular calcium signaling is required for IL-1 α / β production in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages. 第39回日本免疫学会 2009年12月4日 大阪
 16. 酒井俊祐、河村伊久雄、内山良介、光山正雄 The PD-1:PD-L1 pathway is involved in the persistent infection with *Mycobacterium bovis* BCG. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月

- 13日 名古屋国際会議場
17. Sylvia Daim、河村伊久雄、原英樹、申艶娜、暮沼武士、光山正雄 *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein alters the early cytokine response of macrophages. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月13日 名古屋国際会議場
 18. Daim, S., Kawamura, I., Kurenuma, T., and Mitsuyama, M. Possible role of PPE37 protein in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月2日 京都
 19. Sakai, S., Kawamura, I., Uchiyama, R., Okazaki, T., and Mitsuyama, M. The PD-1:PD-L1 pathway inhibits the protective immunity and contributes to the bacterial persistence in mycobacterial infection. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月2日 京都
 20. Kawamura, I., Kaku, T., Uchiyama, R., Kurenuma, T., and Mitsuyama, M. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected macrophages via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. US-Japan Cooperative Medical Science Program The 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2008年7月8日 Baltimore, MD, USA.
 21. Mitsuyama, M. The interaction between *Listeria monocytogenes* virulence factors and the host macrophages The 9th Korea-Japan International Symposium of Microbiology 2008年10月17日 Seoul, Korea.
 22. Mitsuyama M. Critical involvement of bacterial virulence factor in the host immune response to *Listeria monocytogenes* International Union of Microbiological Societies 2008. 2008年8月8日 Istanbul, Turkey
 23. 酒井俊祐、河村伊久雄、内山良介、光山正雄 結核菌およびBCGの持続感染における免疫抑制受容体PD-1の役割 第19回日本生体防御学会 2008年7月12日 札幌
 24. 暮沼武士、内山良介、河村伊久雄、光山正雄 結核菌病原遺伝子領域RD1が関与するIFN- γ 産生誘導機序の解析 第82回日本細菌学会総会 2008年3月26日 京都
 25. Uchiyama, R., Kawamura, I., Tsuchiya, K., Tominaga, T., Sakai, S., Nomura, T., and Mitsuyama, M. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. 第37回日本免疫学会 2007年11月21日 東京
 26. Mitsuyama, M. Mechanism in the requirement of listeriolysin O for the induction of caspase-dependent cytokines in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. The 13th International Congress of Immunology, 2007年8月25日 Rio de Janeiro, Brazil.
 27. Kawamura, I., Uchiyama, R., and Mitsuyama, M. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv but not H37Ra induces generation of intracellular reactive oxygen species and replicates in macrophage-like RAW 264 cells. The 41th US-Japan conference on tuberculosis and leprosy. 2006年7月19日 Kagoshima, Japan.
(上記の他 30件)
- [図書] (計 6件)
1. 光山正雄 細菌と感染 (分担執筆) 現代生物科学入門 第5巻 免疫・感染生物学 岩波書店 東京 2011年
 2. 光山正雄 (編集、分担執筆) 感染症—ウイルス・細菌・寄生虫の感染戦略 羊土社 東京 2009年
 3. Masao Mitsuyama Adaptive immunity to *Listeria monocytogenes* (分担執筆 chapter 14, pp.427-448) Handbook of *Listeria monocytogenes* (Liu Don eds.) CRC Press, New York. 2008年
(上記他 3件)
- [その他]
ホームページ等
<http://bisei15.mb.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
光山正雄 (MITSUYAMA MASAO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：10117260