

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15147

研究課題名(和文) ビブリオが誘導する鉄関連細胞死のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of ferroptosis-like cell death induced by Vibrio

研究代表者

後藤 和義 (Gotoh, Kazuyoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20626593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、ビブリオ・アルギノリティカスのIII型分泌装置エフェクター分子であるVepAによる鉄依存的細胞死メカニズムについて解析を行った。組換えVepAタンパク質をHeLa細胞内にトランスフェクションし、誘導される細胞死を観察した。細胞膜透過性の二価鉄キレート剤により菌体感染による細胞死は完全に抑制されるのに対し、組換えVepAによる細胞死では抑制効果は部分的であった。VepA依存的細胞死誘導への鉄の関与は否定的となった。また、カテプシン、カルシウムイオン、プロトン、小胞体ストレスの関与も低いと考えられた。VepA依存的細胞死は新規の細胞死メカニズムが関与している可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞生物学において細胞死は大きくネクローシスとアポトーシスに分けられると考えられてきた。近年、この二分類のみならずさまざまなタイプの細胞死経路が報告されている。病原細菌は宿主であるヒトの細胞に対し多様な細胞死を引き起こしていると考えられるがその多くは未だ謎のままである。本研究成果は病原細菌がカスパーゼ依存的アポトーシスという新しいタイプの細胞死を誘導することを見いだした。細菌学の研究から細胞生物学の新しい知見が得られるという点は、異分野研究が相互に関与することで科学が進歩するという意義がある。本研究成果はその一例と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Opportunistic pathogen, *Vibrio alginolyticus* induce cell death via effector VepA in type III secretion system. I found this cell death depends on intracellular ferrous ion, calling this type of cell death ferroptosis. When I transfected recombinant VepA into HeLa cell, I observed cell death that is similar with that by *V. alginolyticus* infection. In this condition, I treated the cell with ferrous chelater in the cell death induction by VepA-transfection. Unlike the infection experiment, that cell death didn't inhibit by ferrous chelataing. Hence, I deny correlation between VepA-dependent cell death and intracellular ferrous ion. I also examined other possible mechanism of the cell death such as cathepsin, calcium ion, proton and ER stress. However, these factor didn't relate to this cell death. I concluded that novel mechanism hides in VepA-dependent cell death.

研究分野：細菌学

キーワード：Vibrio alginolyticus 細胞死 鉄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Vibrio alginolyticus は海水に生息するグラム陰性桿菌で、ヒトに日和見感染を起こすことがある。本菌の病原性を研究するために *in vivo* と *in vitro* における感染モデルが用いられてきた。マウスを用いた腹腔内接種感染モデルにおいて本菌はマウス致死活性を示すことが知られる。*In vitro* では HeLa 細胞にネクロシス様細胞死を誘導することが知られる。*In vitro* モデルにおいて細胞死を誘導する病原因子は III 型分泌装置と考えられている。III 型分泌装置はグラム陰性菌が広く保有する注射針様の装置であり、宿主細胞に対しエフェクターと呼ばれるタンパク質を注入する。細菌種によって様々な機能をもつエフェクターが知られ、代表的なものとして宿主細胞の細胞死を誘導するエフェクターが知られる。

申請者は *V. alginolyticus* の III 型分泌装置エフェクターのうちどれが HeLa 細胞の細胞死誘導に関与するか解析した。その結果、同じ *Vibrio* 属の *V. parahaemolyticus* の VepA と呼ばれるエフェクターのホモログが細胞死誘導に関与することを見出した (図 1 A)。

V. parahaemolyticus において、VepA はリソソームに小孔を形成することにより細胞死を誘導することが報告されていた。そこで申請者は、*V. alginolyticus* において同様の細胞死機構を示すか解析したところ VepA はリソソームに小孔を形成する可能性が示唆された。デキストラン分子を用いた観察によりこの小孔はタンパク質より少分子を漏出させていることが示唆された。これを裏付ける証拠としてリソソーム内システインプロテアーゼであるカテプシンは細胞死に関与しなかった。リソソーム内の少分子で細胞死を誘導するものとして二価鉄イオン Fe^{2+} が考えられる。そこで申請者は二価鉄イオンキレーターが VepA による再防止誘導を抑制するか解析した。その結果、*V. alginolyticus* の VepA による細胞死誘導は、二価鉄イオン依存적であると仮説を立てた (図 1 B)。

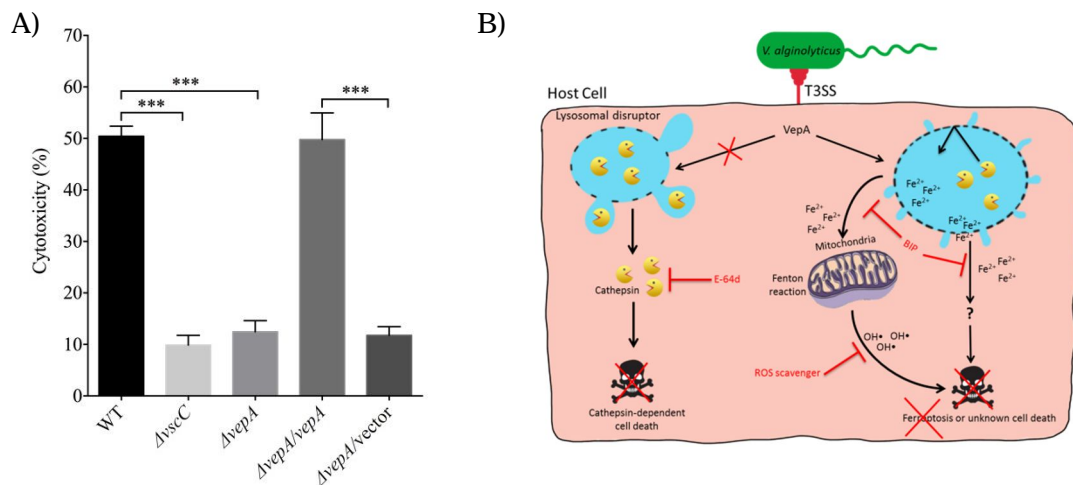


図 1 *V. alginolyticus* の *in vitro* 細胞毒性 (A)、HeLa 細胞に対して野生株 (WT)、III 型分泌装置遺伝子破壊株 ($\Delta vscC$)、VepA 遺伝子破壊株 ($\Delta vepA$) のそれぞれを MOI 100 で感染させ、細胞死を LDH 放出により評価した。*V. alginolyticus* の細胞死誘導機構の仮説 (B)、二価鉄イオンのリソソームからの漏出により細胞死が誘導されると仮説を立てた。

2. 研究の目的

申請者がこれまでに得た結果から VepA によりリソソームから漏出する細胞死原因物質は二価鉄イオン (Fe^{2+}) であると考えた。確かに、リソソームは遊離鉄の貯蔵庫として知られる。本研究の目的は、VepA 依存的なリソソーム漏出が Fe^{2+} の細胞質への移動を起こすかどうかを証明し、更には通常フェロトシスとその特徴を比較解析することで、VepA 依存細胞死のメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

組換え His-tag VepA タンパク質は大腸菌発現系を用いて発現させ、Ni カラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた組換え VepA は、センダウイルス・エンベロープベクターを用いて HeLa 細胞にトランスフェクションし、誘導される細胞死をヨウ化プロピジウム (PI) 染色により観察した。リソソーム膜の透過性を調べるためにニュートラルレッドを細胞内リソソーム集積させ色素の消失により漏出を解析した。

4. 研究成果

組換え His-tag 融合 VepA タンパク質生産・精製し純度の高い組換えタンパクを得た。組換えタンパクを HeLa 細胞に導入したところ、VepA それ単体で細胞死を誘導した(図 2A)。このとき、リソソームの漏出を確認したところ VepA 依存的にリソソームに集積したニュートラルレッドが消失した(図 2D)。以上より、VepA タンパク質それ単体でピブリオ・アルギノリチカスの菌体接種により誘導される細胞死が再現できた。

また、細胞膜透過性の二価鉄キレート剤により VepA 依存性細胞死が抑制されるかどうかを検討したところ、ピブリオ・アルギノリチカスの菌体感染では完全に抑制されるのに対し、組換え VepA のトランスフェクションによる細胞死では抑制効果は部分的であった。

そこで、VepA が誘導する細胞死のタイプを解析するため様々な阻害剤を用いて解析を行った。その結果 VepA 依存性細胞死は、アポトーシスの阻害剤である汎カスパーゼ阻害剤により部分的に阻害され、さらにカスパーゼ基質の分解を確認した。これはアポトーシスを示唆する。しかしながら本細胞死は、細胞に対し速やかにヨウ化プロビジウムの細胞内透過をもたらし同時に確認した。S. Yoon ら (2014) の報告では、カスパーゼ依存性のネクローシスといういわばカスパーゼとネクローシスの中間のような細胞死があり得ることを示している。*V. alginolyticus* の VepA 依存性細胞死はこれまでに知られる典型的なアポトーシスまたはネクローシスとは異なる新しいタイプの細胞死を示すことが考えられる。

V. parahaemolyticus において VepA の標的分子はリソソーム膜上の V_1 -ATPase であると報告されている。リソソーム膜状に於いて VepA は小孔を形成し、タンパク質よりも小さな分子を漏出させる。このとき漏出する分子が細胞死のトリガーになっていると考えられる。申請者は当初二価鉄イオンを疑っていたが、結果は否定的であった。そこで、リソソームに貯蔵されていると考えられる二価鉄イオン以外の分子の細胞死への関与についても検討した。その結果、パフィロマイシンは細胞死に影響を与えず、プロトンが関与している可能性は低いと考えられた。その他にも細胞膜透過性カルシウムキレーターでも細胞死に影響がなく、カルシウムイオンが関与している可能性も否定的であった。リソソーム膜状のナトリウムチャンネル阻害剤も同様に無効化であった。リソソームから漏出してくる少分子について検討したが、本研究ではその分子を特定するには至らなかった。

V. alginolyticus の VepA がリソソーム膜だけでなく小胞体膜を傷害している可能性を考え、各種の小胞体ストレス経路阻害剤を用いて検討した。その結果、いずれの小胞体ストレス経路も本細胞死には関与していないと考えられた。

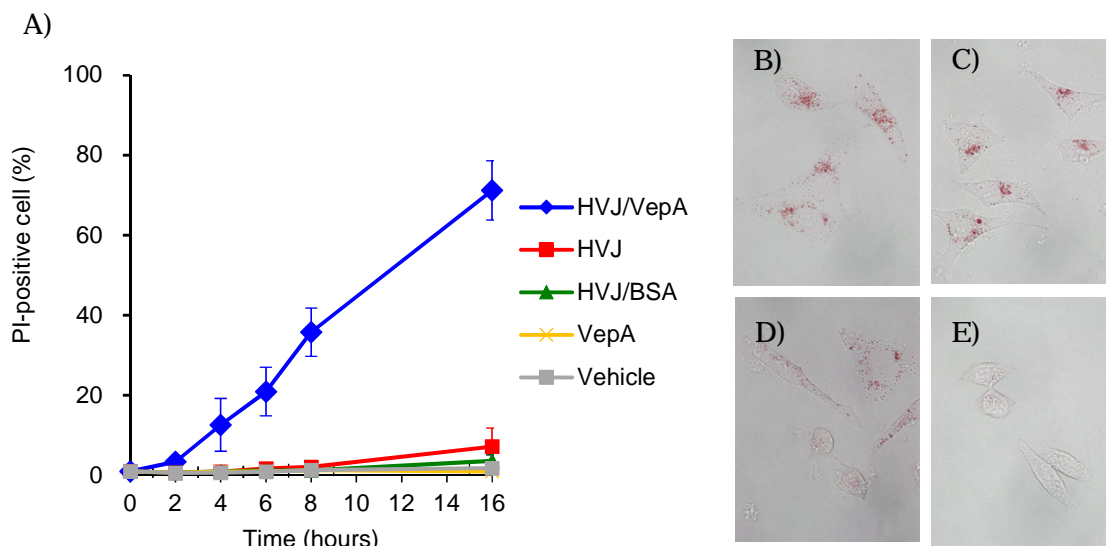


図 2 センダイウイルスエンベロープを利用してリコンビナント VepA を HeLa 細胞へ導入し細胞死を観察した結果 (A)。細胞死はヨウ化プロビジウム (PI) 陽性細胞数で評価した。VepA のトランスフェクションによるリソソームからのニュートラルレッドの漏出 (A, B, C, D)。未導入 (B)、ウイルスベクター (C)、ウイルスベクター + VepA (D)、リソソーム破裂剤 LLOMe 処理 (E) をそれぞれ示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuda S, Okada R, Tandhavanant S, Hiyoshi H, Gotoh K, Iida T, Kodama T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Export of a <i>Vibrio parahaemolyticus</i> toxin by the Sec and type III secretion machineries in tandem.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 781-788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41564-019-0368-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤和義、中居絵梨奈、美間健彦、山本由弥子、横田憲治、松下治
2. 発表標題 <i>Vibrio alginolyticus</i> によるリソソームの破裂を伴う細胞死
3. 学会等名 第29回生物試料分析科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美間健彦、西川裕太郎、中田悠介、波多野直哉、後藤和義、山本由弥子、横田憲治、松下治
2. 発表標題 <i>Vibrio alginolyticus</i> のHapRによるコラゲナーゼ発現調節機構の解明
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美間健彦、Agus Eka Darwinata、後藤和義、山本由弥子、松下治
2. 発表標題 Regulation of small RNA expression in <i>Vibrio alginolyticus</i>
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美間健彦、Agus Eka Darwinata、後藤和義、山本由弥子、松下治
2. 発表標題 Vibrio alginolyticusのArcAによるsRNA1発現調節機構の解明
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----