

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890122

研究課題名（和文） 感染時における細菌および宿主防御機構の解明

研究課題名（英文） Study on defense mechanisms of bacteria and host cells in infection.

研究代表者

西野 美都子 (NISHINO MITSUKO)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：30510440

研究成果の概要（和文）：細菌感染時において、宿主細胞側の防御システムとして働く重要な機構の一つにオートファジーがある。オートファジーが起ると、細胞質にオートファゴソームと呼ばれる特殊な膜構造が現れ、病原菌を取り囲む。この膜の起源は生物学における 50 年来の謎であった。我々は、分子生物学的解析及び電子線トモグラフィ法により、初めてオートファジーの膜の起源を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is a bulk degradation process in eukaryotic cells and functions as one of defense mechanisms upon bacterial infection. The origin and source of autophagosomal membranes are long-standing questions. We revealed by using both molecular biological tools and electron tomography that the endoplasmic reticulum is a source for autophagosomal membranes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：感染症、細菌、オートファジー、輸送体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性菌の出現が医療現場において大きな問題となっている。化学療法が困難な多剤耐性菌の出現により、人類は多くの感染症の脅威に曝されており、今日もなお感染症の克服は医学的重要課題の一つである。一方で、細菌ゲノム配列が次々と解読され、細菌染色体上には、数多くの薬剤耐性ならびに病原性遺伝子が潜在していることが明らかになってきた。これからは細菌が保持する薬剤耐性因子および病原因

子の制御ネットワークを、ゲノムワイドに包括的に解析し、耐性菌感染症克服のための基盤を構築する必要がある。これまでに、サルモネラのゲノム情報をもとに、推定排出蛋白質遺伝子とその制御遺伝子を網羅的に解析することで、数多くの耐性因子が同定されている。排出蛋白質は抗菌薬や細胞障害性異物を菌体外に排出するのみではなく、細菌代謝産物の排出、細胞間情報伝達や病原性発現制御にも関与していることが分かってきた。

細菌は様々な環境で生存するための戦略として、ゲノム上に多くの環境適応・耐性因子を保持している。排出蛋白質遺伝子は細菌ゲノムに存在する最も基本的な生存戦略因子である。本研究ではサルモネラや緑膿菌等の病原細菌染色体上に潜む排出蛋白質遺伝子解析を中心に、細菌が持つ宿主環境適応調節ネットワークを網羅的に解析し、細菌ゲノム生存戦略の仕組みを理解する。また、排出蛋白質の阻害剤を探索し、病原感染細菌の病原性軽減ならびに多剤耐性化克服を目指す。さらには、これら排出蛋白質が宿主細胞に与える影響や、宿主細胞内に存在する細菌自身に与える影響を調べるため、電子顕微鏡トモグラフィーをはじめとした形態観察を行う。感染時におけるメムبران・トラフィックの影響についても解析する予定である。

## 2. 研究の目的

(1) 病原細菌が宿主に感染した際に、どのような細胞制御が行われるのかを、細菌側および宿主側の両反応を解析することにより解明し、感染システムの動作原理を理解する。宿主側の病原菌感染防御システムに重要である自食作用（オートファジー）の解析を行う。オートファジーは真核生物に普遍的に見られる現象であり、細胞内の不要タンパク質や病原菌を分解し、生命の維持に重要な役割を果たしている。オートファジーが起ると、細胞質にオートファゴソームと呼ばれる直径1ミクロン程度の特殊な2重膜構造が現れ、不要タンパク質や病原菌を取り囲む。本研究において、長年の謎であったオートファゴソームの膜の起源について、解析を行い明らかにする。

(2) 近年、抗生物質が効かない病原性細菌（多剤耐性菌）の出現および感染拡大が医療現場において大きな問題となっている。多剤排出には、細菌のもつ排出蛋白質が深く関与している。マウスへのサルモネラ感染実験において、9種類の排出蛋白質をそれぞれ欠損させた菌株を感染させると、*macAB* 遺伝子欠損株のマウス致死能力は野生株と比較して顕著に低下し、薬剤排出系として強力に機能している *acrB* 遺伝子を欠損させた効果よりも大きいことが明らかとなっている。そこで本研究では、宿主細胞内環境下での排出蛋白質の発現変化を調べ、感染によって発現制御される排出蛋白質を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス由来繊維芽細胞(NIH3T3細胞)にコントロールベクターまたはオートファゴソームの形成を途中で止める変異体である *Atg4B<sup>C74A</sup>* を導入し、栄養飢餓培地で細胞を1時間培養し、オートファジーを誘導させた。

免疫電子顕微鏡法を用いオートファゴソームを検出し、電子顕微鏡で形態学的解析を行った。更に電子線トモグラフィーを用いて形成途中のオートファゴソームの詳細を3次元的に解析した。

(2) 免疫細胞であるマクロファージにサルモネラを感染させ、一定時間培養後サルモネラからメッセンジャーRNAを単離した。定量PCR法を用いて9種類の排出蛋白質のメッセンジャーRNA量の転写量を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 栄養飢餓状態にした NIH3T3 細胞を用い伸展中の隔離膜を電子顕微鏡で詳細に観察した。その結果、隔離膜にしばしば粗面小胞体が近接していることを見いだした。オートファジー関連分子の一つである、*Atg4B* の変異体 (*Atg4B<sup>C74A</sup>*) を細胞に過剰発現させると、オートファゴソーム形成が阻害され、隔離膜が細胞質中に蓄積する。そこで、我々は *Atg4B<sup>C74A</sup>* 過剰発現細胞中に蓄積した隔離膜を観察した結果、その殆どに小胞体が近接していることを見いだした。この結果から、初期オートファゴソーム形成過程において、小胞体が関与していることが示唆された。

次に、我々は小胞体と隔離膜の関係を詳細に調べるため、電子線トモグラフィーを用いて解析することにした。電子線トモグラフィーは近年注目されつつある先端技術の一つであり、高い解像度で細胞内膜構造の3次元像を得ることができる。我々は、小胞体が付着した隔離膜を”小胞体-隔離膜複合体”と名付け、複数の異なるこれら複合体を3次元構築した。その結果、小胞体-隔離膜複合体は小胞体の一部(サブドメインが)湾曲し、ゆりかごのような構造を作り隔離膜を包み込んでいることが明らかになった(図)。さらに我々は、隔離膜の先端部分が小胞体サブドメインと直接繋がっていることを見いだした。以上の結果から、隔離膜は小胞体サブドメインが変形して生じていることが示唆された。本研究成果をまとめた論文は *Nature Cell Biology* 誌に発表され、さらに、本論文は、一流研究者数十名が最新の論文の中から優れたものを推薦するシステムである Faculty of 1000 Biology の評価システムにおいて、重要な論文として”Must Read”に選出された。

(2) 免疫細胞であるマクロファージにサルモネラを感染させ、一定時間後の各排出蛋白質のメッセンジャーRNA量の転写量の変化を定量PCR法により解析した。その結果、*macAB* を含む3種の排出蛋白質のメッセンジャーRNA転写量が顕著に上昇していることが判明した。特に、*macAB* は非感染時と比較して20倍以上も転写量が上昇していた。一方、細菌の主要な薬剤排

出系である *acrAB* 遺伝子の転写量は変化しなかった。したがって、*macAB* 遺伝子がマクロファージ内において何らかの重要な役割を担っている事が示唆された。

以上、これらの知見は、感染症を克服する新規治療法開発に役立つものと期待される。

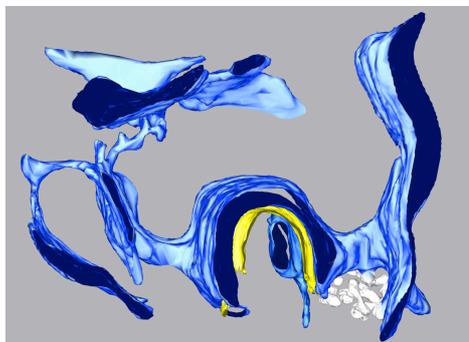


図. オートファゴソーム形成の 3D モデル

## 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計9件)

- ① Nishino, K., Yamasaki, S., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi A. (2010) Effect of overexpression of small noncoding DsrA RNA on multidrug efflux in *Escherichia coli*. **J Antimicrob. Chemother.** 66:291-296. 査読有
- ② †Hirakawa, H., †Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A., Nishino, K. (2010) Indole enhances acid resistance in *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.** 49:90-94. († Co-first authors) 査読有
- ③ Nishino, K., Yamasaki, S., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A. (2010) Effect of NlpE overproduction on multidrug resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother.** 54:2239-2243. 査読有
- ④ Yamada, J., Yamasaki, S., Hirakawa, H., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A., Nishino, K. (2010) Impact of the RNA chaperone Hfq on multidrug resistance in *Escherichia coli*. **J. Antimicrob. Chemother.** 65:853-858. 査読有

⑤西野-林 美都子 (2010) 電子線トモグラフィーによるオートファジーの解析. 顕微鏡 45:77-79. 査読無

⑥Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., Yamamoto, A. (2010) Electron tomography reveals the endoplasmic reticulum as a membrane source for autophagosome formation. **Autophagy** 6:301-303. 査読有

⑦Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. **Nature Cell Biology** 11:1433-1437. 査読有

⑧ Nishino, K., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A. (2009) H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing multidrug efflux genes *acrEF*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53:3541-3543. 査読有

⑨Nishino, K., Senda, Y., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A. (2009) Role of the AraC-XylS family regulator YdeO in multi-drug resistance of *Escherichia coli*. **J. Antibiot.** 62:251-257. 査読有

[学会発表] (計15件、内招待講演3件)

- ① Hayashi-Nishino, M., Electron Tomography Revealed the Endoplasmic Reticulum as a Source of Autophagosomal Membranes, ASM American Society for Microbiology 110th General Meeting, 2010年5月24日, San Diego, CA, USA
- ② Hayashi-Nishino, M., Electron Tomography Revealed a Subdomain of

the Endoplasmic Reticulum as a Cradle for Autophagosome Formation, The 13<sup>th</sup> Sanken International Symposium, 2010年1月18日, Osaka

③ 西野美都子、Electron Tomography Revealed a Subdomain of the Endoplasmic Reticulum as a Cradle for Autophagosome Formation, 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2009年12月1日、大阪大学 (大阪府)

④ 西野美都子、電子線トモグラフィーにより見いだされた、オートファゴソームを形成する”ゆりかご”としての小胞体サブドメイン、視る生物学4 —進化するイメージング—, 2009年11月24日、奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県)  
(招待講演)

⑤ Hayashi-Nishino, M., Autophagy and the Endoplasmic Reticulum, 5<sup>th</sup> International Symposium on Autophagy Meeting, 2009年9月25日, Otsu, Shiga  
(招待講演)

⑥ 西野美都子、電子線トモグラフィーを用いたダイナミン1ノックアウトマウスの神経終末におけるエンドサイトーシス中間体の解析、第52回日本神経化学学会大会 シンポジウム, 2009年6月23日、伊香保温泉 ホテル天坊(群馬県)  
(招待講演)

⑦ 西野美都子、電子線トモグラフィーにより見いだされた、オートファゴソームを形成する”ゆりかご”としての小胞体サブドメイン、第61回日本細胞生物学会大会, 2009年6月4日、名古屋国際会議場 (愛知県)  
他8件

[その他]  
受賞等、特記事項

① Faculty of 1000 Biology “Must Read”  
(2009年12月)

英科学誌Nature Cell Biologyに掲載された論文(論文業績⑦)が、一流研究者数十名から構成される論文評価システムにおいて、重要な論文として”Must Read”に選出された  
(<http://www.f1000biology.com/article/id/1331957>)。

② 「日経産業新聞」掲載 (2009年11月)  
“包む膜の仕組み解明 小胞体が延伸”



6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
西野 美都子 (NISHINO MITSUKO)  
大阪大学・産業科学研究所・特任助教 (常勤)  
研究者番号 : 30510440
  - (2) 研究分担者  
該当なし
  - (3) 連携研究者  
該当無し