

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）	Growth activity and virulence mechanism of 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

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：細胞内寄生菌、リステリア、抗酸菌、マクロファージ、病原性

1. 研究計画の概要

感染現象は、単純には微生物が宿主に侵入して増殖することとしてとらえられるが、その成立、維持、進展は、微生物の多彩な病原性因子と多様な宿主防御機構（自然免疫、獲得免疫）相互の力関係によって規定される極めて複雑な事象である。病原細菌の中には、タンパク毒素など強力な病原因子を産生して宿主の細胞や臓器を傷害するものも多いが、本特定研究「感染のマトリックス」B03項目で対象とする細胞内寄生菌は、宿主感染防御機構の中心となる食細胞の細胞内殺菌を免れて増殖し、その結果病原性を発揮する。そこで本研究では、とくに細胞内寄生性を示すリステリア (*Listeria monocytogenes*) と抗酸菌の代表である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) および *Mycobacterium bovis* BCG をとりあげ、それらの菌が宿主細胞内にマクロファージ系細胞内で如何に細胞内殺菌を回避して生存・増殖することが可能であり、またその結果宿主にどのような分子応答を惹起するかを分子細菌学的観点と感染防御免疫学的観点の双方から解明することが目的である。

2. 研究の進捗状況

（研究方法も含め 600～800 程度で記述）

リステリアに関しては、主要病原因子遺伝子座である LIPI-1 に着目し、とくに LL0 タンパクをコードする hly 遺伝子の欠損変異株を作成して、本菌のマクロファージ内増殖および宿主サイトカイン応答における役割の分子機構を解明してきた。欠損変異株に種々の変異遺伝子を相補させた株を多数作成して主に *in vitro* で感染実験を行ない、次のような主要な知見が得られた。i) リステリア刺激に対するサイトカイン応答には、細胞質への脱出に依存するものとしめないものがあり、NF- κ B 活性化は TLR2, 4 に依存する。ii)

細胞質脱出に依存する最も重要なサイトカインは IL-18 であり、その成熟分泌には caspase-1 活性化が LL0 の N 末端依存的に起こることが必須。iii) caspase-1 活性化には宿主細胞質での LL0 認識と ASC 依存的なインフラマソーム形成が不可欠。

結核菌はとくに VII 型分泌機構を構成すると考えられる RD-1 領域産物に着目し、RD-1 欠損変異株を用いて、以下の主要な知見が得られた。i) RD-1 領域の有無は菌の宿主マクロファージ内増殖には一義的には大きな意味をもたない。ii) RD-1 領域が欠損すると caspase-1 活性化が起こり難くなる。iii) RD-1 依存的な caspase-1 活性化には、K⁺イオンの流出が重要な役割を果たしている。iv) RD-1 領域産物は、感染細胞の細胞死に関与しており、ミトコンドリア膜傷害と ATP 枯渇を介している可能性が高い。

3. 現在までの達成度

<区分>②おおむね順調に進展している。

欠損変異株や相補株の作成は概ね順調に進行し、それらを用いた実験から、上記の成果が得られた。とくにリステリアの hly 遺伝子の *in frame* 完全欠損変異株の確立と各種遺伝子相補株の作製はほぼ予定した通りに進行し、解析結果は以前の LL0 のリコンビナントタンパク質を用いた知見と相容れるものであったので、概ね順調と評価できる。

4. 今後の研究の推進方策

今後は、リステリアおよび結核菌について、以下の点についての解析を進める予定である。

[リステリアに関する研究]

i) リステリア感染における caspase-1 成熟化の誘導機序の解明：各種遺伝子組換え体を用いた caspase-1 活性化を誘導するリステリア側分子構造の特定とシグナル伝達機構の解明。

ii) LLO を認識する NLR 分子の探索と同等：RNAi や候補遺伝子トランスフェクション細胞を用いて実施。

iii) Type I IFN 発現やオートファジー誘導に関わる分子の同定：I 型 IFN 誘導能の異なる菌株を用いた比較実験の実施。

iv) LIPI-1 領域の病原因子遺伝子の細胞内増殖への協同的作用の解明：病原因子遺伝子の 2 重欠損変異株を用いた比較実験の実施。

[結核菌など抗酸菌]

i) 結核菌の病原因子候補としての Pe-PPE 遺伝子の役割の解明：特定の PE-PPE 遺伝子の欠損変異株、強制発現株を用いた病原性の変化の解析。

ii) RD-1 領域遺伝子座の宿主マクロファージ応答誘導機構の解析：RD-1 領域欠損変異株と相補復帰株を用いて、その違いを規定する宿主側分子を検索する。

iii) 結核菌の持続感染機構にける宿主側の PD1/PD-L1 相互作用の役割の解明：PD-L1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いた感染動態と感染抵抗性 T 細胞の誘導・維持の違いの解析。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 21 件)

- 1) Hara H, Tsuchiya K, Nomura T, Kawamura I, Shoma S & 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.* 180 :7859-7868, 2008.
- 2) Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, Nomura T, Hara H, Uchiyama R, Daim S & 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.* 76 :1547-1557, 2008.
- 3) Hara H, Kawamura I, Nomura T, Tominaga T & Mitsuyama M : Cytolysin-dependent endosomal escape is required but not sufficient for the induction of Th1 immune response against *Listeria* infection: A distinct role for listeriolysin O as determined by cytolysin gene replacement. *Infect. Immun.* 75 : 3791-3801, 2007
- 4) Kaku T, Kawamura I, Uchiyama R, Kurenuma T & Mitsuyama M : RD1 region in mycobacterial genome is involved in induction of necrosis in the infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiol. Lett.* 274 : 189-195, 2007.

- 5) Uchiyama R, Kawamura I, Kawanishi M, Tsuchiya K, Tominaga T, Kaku T, Fukasawa Y, Sakai S, Fujimura T, Nomura T & Mitsuyama M : *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv is capable of inhibiting necrosis of the infected macrophages via activation of caspase-9. *Infect. Immun.* 75 : 2894-2902, 2007.

[学会発表] (計 11 件 : 国際学会、シンポジウムのみについて)

1) 光山正雄: 細胞内寄生性リステリア病原因子による宿主免疫応答の誘導機構-生菌免疫の作用機序へのアプローチ-。第 82 回日本細菌学会 浅川賞受賞講演 2009 年 3 月 13 日、名古屋。

2) Masao Mitsuyama : *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* and the host cytokine response. 第 11 回京都大学・復旦大学国際シンポジウム。2008 年 10 月 11 日。上海、中国。

3) Masao Mitsuyama (Plenary lecture) : Critical involvement of bacterial virulence factor in the host immune response to *Listeria monocytogenes*.

国際微生物学会議 2008 (IUMS2008)。2008 年 8 月 8 日。イスタンブール、トルコ

4) Masao Mitsuyama : Mechanism in the requirement of listeriolysin O (LLO) for the induction of caspase-dependent cytokines in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. 第 13 回国際免疫学会シンポジウム、2007 年 8 月 25 日、リオデジャネイロ、ブラジル。

5) 光山正雄: リステリア感染マクロファージにおけるサイトカイン応答の多様性。第 79 回日本細菌学会総会シンポジウム S4 : 細菌と宿主の攻防。平成 18 年 3 月 30 日 金沢市

[図書] (計 4 件)

1) Masao Mitsuyama : Adaptive Immunity to *Listeria monocytogenes*. Chapter 14 (pp427-448) In Handbook of *Listeria monocytogenes* Ed by Dongyou Liu Total Pages: 540 pages, CRC Press New York, 2008.

2) 光山正雄 (編集、分担執筆) : 生体防御医学事典 (鈴木和男監修, 光山正雄他編著) 朝倉書店 総頁数 362, 2007.

3) 光山正雄 (監訳) : メルクマニュアル第 18 版。171-175 章, 日経 BP 社、2006

4) 光山正雄 : 結核 (泉孝英監修 富岡洋海編集 改訂第 4 版) 第 1 章 A 結核菌の基礎 pp. 3-17, 医学書院 総頁数 458, 2006.