

令和元年6月11日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08469

研究課題名(和文) インターフェロンによる細胞内寄生菌に対するゼノファジーの制御機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of interferon gamma mediated xenophagy against intracellular bacteria

研究代表者

松澤 健志 (Matsuzawa, Takeshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：80370154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インターフェロン(IFN- γ)はマクロファージの主要なアクチベーターであり、通常のマクロファージの殺菌作用を回避する細胞内寄生菌に対してIFN- γ 誘導性細胞自律的自然免疫が重要である。これまでに我々の研究グループでは、宿主細胞の自己成分分解システムであるオートファジーがIFN- γ 誘導性細胞自律的自然免疫に關与する事を明らかにしている。本研究において、Listeria monocytogenesに対するIFN- γ 誘導性オートファジーの特徴を解析し、IFN- γ 刺激マクロファージでLC3 associated phagocytosis (LAP)が活性化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

選択的オートファジーは損傷ミトコンドリアの排除等、生体の恒常性維持の観点からだけでなく、細菌を含む病原細菌の感染防御や腫瘍細胞の駆除等、生体防御の観点からも重要である。IFN- γ による選択的オートファジーの活性化メカニズムの一端を解明した本研究は、オートファジーがどのようにして選択性・特異性を上昇させているのかを理解する一助となる。以上のことから本研究により、細菌感染症学領域だけでなく細胞生物学領域における新たな知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Professional phagocytes, such as macrophages, have a specialized apparatus for use against invading pathogens. After phagocytosis, pathogens are eliminated by these phagocytes. Intracellular bacteria have survival strategies that interfere with the bactericidal ability of phagocytes. Interferon- γ (IFN- γ) is a potent macrophage activator, and stimulation by this cytokine is critical for cell-autonomous innate immunity against intracellular bacteria. Our group has previously demonstrated that autophagy, a host degradation system, is activated by IFN- γ , and this action contributes to IFN- γ -mediated innate immunity.

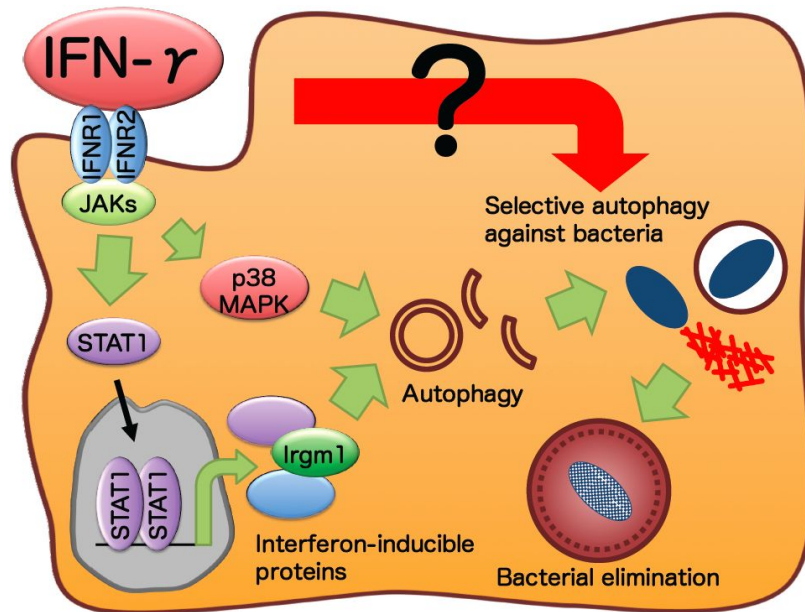
Here, we characterized the IFN- γ -mediated selective autophagy against Listeria monocytogenes, and these phenotypes are consistent with LC3-associated phagocytosis (LAP), which has recently emerged as an innate immune response that is related to autophagy. We therefore conclude that LAP is mobilized for IFN- γ -mediated cell-autonomous innate immunity.

研究分野：細菌感染学

キーワード：細胞内寄生菌 自然免疫 細胞自律的免疫 マクロファージ インターフェロン オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーはリソソームを分解の場とする細胞内分解システムであり、細胞内タンパク質や小器官がそのターゲットとなる。細菌感染時にはオートファジーは細胞内に侵入した細菌を認識しリソソームまで輸送し、細菌を分解するため、感染症学・免疫学においても注目されているメカニズムである。



飢餓などのストレスで誘導されるオートファジーや、誘導刺激が無い通常状態で起きる基底レベルの

図；申請者はこれまでにIFN- γ 活性化マクロファージで、p38 MAPKやIrgm1を介してオートファジーが活性化することを明らかにしている。さらにIFN- γ 活性化マクロファージでは細胞内に侵入した細菌に対する選択的オートファジーの機能も上昇していることを見いだしているが、その分子メカニズムは不明である。

オートファジーは特異性を持たず細胞質成分を無差別に分解する。一方、損傷したミトコンドリアや細胞内に侵入した病原体を排除するために形成されるオートファゴソームは特異性を持った選択的オートファジーであり、ミトコンドリアに対するものはマイトファジー、病原体に対するものはゼノファジーと呼ばれる。日本の研究者を中心としたこれまでの研究によりオートファジーの基本的な分子メカニズムや生理機能が明らかにされているが、選択的オートファジーにおける標的認識メカニズムには不明な点が多く残されている。

病原体が生体内に侵入した場合、病原体と直接戦うのはマクロファージを代表とする食細胞であり、マクロファージによる免疫作用はすべての動物に普遍的に必須の生体防御機構である。一方、細胞内寄生菌は、通常の殺菌作用を回避しマクロファージ内で生存・増殖する。このような細胞内寄生菌に対する感染防御には、マクロファージ自身の感染防御機構である細胞自律的自然免疫 (cell autonomous innate immunity) の強化が重要である。インターフェロン (IFN-) はマクロファージの主要なアクチベーターであり、細胞内寄生菌に対する細胞自律的自然免疫を活性化する。IFN- のマクロファージ活性化作用は自然免疫システムにおいて重要なステップである。

2. 研究の目的

我々の研究グループでは、これまでに IFN- 刺激マクロファージで p38 MAPK や IFN 誘導性 GTP 結合タンパク質の一つである Irgm1 を介してオートファジーが活性化すること (Matsuzawa et al. J Immunol 2012) Irgm1 の細菌侵入部位への集積 (Tiwari, Matsuzawa et al. Nat Immunol 2009) や、IFN- によるオートファジー活性化がマクロファージの殺菌作用に重要である事 (Matsuzawa et al. Immunology 2014) を明らかにしている。また、細菌感染の刺激でもオートファジーが活性化する事も明らかにしている (Fujiwara, Matsuzawa et al. J Immunol Methods 2013)。さらにマクロファージに細胞内寄生細菌の一種である *Listeria monocytogenes* を感染させると、IFN- 処理したマクロファージでのみ GFP-LC3 の細菌感染部位への集積が顕著に増加することを見いだしている。この結果は IFN- は単にオートファジーを活性化するだけではなく、細菌に対するゼノファジーの機能も増加させる事を示唆しているが、その分子メカニズムは不明である。そこで本研究では IFN- によるゼノファジーの活性化メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

当研究グループではこれまでに、マクロファージに細胞内寄生細菌の一種である*Listeria monocytogenes*を感染させると、未処理もしくはインターフェロン（IFN- γ ）処理マクロファージいずれにおいても同程度のオートファジーの活性化を観察している。さらに、IFN- γ 処理マクロファージでのみGFP-LC3の細菌感染部位への集積が顕著に上昇することも見いだしている。これらの結果から、IFN- γ は単にオートファジーを活性化するだけでなく、細菌に対する選択的オートファジー（ゼノファジー）の機能も上昇させていると考えられる。そこで本研究ではIFN- γ によるゼノファジー活性化メカニズムの解明のため以下の実験を行った。

1) IFN- γ の下流でオートファジーの選択性・特異性を調節するシグナル伝達経路の解明

IFN- γ によるゼノファジー活性化にp38 MAPKやTBK1が関与するかを調べるため、GFP-LC3発現RAW264.7マクロファージ様細胞にレンチウイルス遺伝子導入法によりshRNA発現ベクターを導入し、p38 MAPKもしくはTBK1をノックダウンした後、*Listeria monocytogenes*を感染させ、*Listeria*感染部位へのGFP-LC3の集積の有無を確認する。IFN誘導性GTP結合タンパク質の発現はSTAT1を介するため、IFN誘導性GTP結合タンパク質の発現を止めるためSTAT1ノックダウン細胞も同様に調べ、IFN- γ によるゼノファジーの活性化にp38 MAPK、TBK1、IFN誘導性タンパク質が関与するかどうかを明らかにした。

2) ユビキチンやオートファジー受容体のIFN- γ 誘導性ゼノファジーへの関与の有無

細菌に対するゼノファジーにはユビキチンやオートファジー受容体のp62とNDP52が関与している事が知られている。そこで、IFN- γ によるゼノファジー活性化が、既知のユビキチンやオートファジー受容体を介するのかどうかを調べるため、IFN- γ 刺激したGFP-LC3発現RAW264.7マクロファージ様細胞に*L. monocytogenes*を感染させ、*Listeria*感染部位へのユビキチン、オートファジーレセプター（p62やNDP52）の集積の有無を調べる。また、既知オートファジー受容体（p62とNDP52）が機能的にIFN- γ によるゼノファジー活性化に関与するかどうかを調べるため、各因子をノックダウンした後、*L. monocytogenes*を感染させ、*Listeria*感染部位へのGFP-LC3の集積の有無を調べた。

3) IFN- γ によるゼノファジーの活性化メカニズムの解明

研究計画1、2によりIFN- γ によるゼノファジーの活性化への関与が明らかになった分子について、その遺伝子のノックアウトマウスや骨髄性細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスが入手可能であれば、購入後、マウスから分離した骨髄由来マクロファージを用いて*Listeria*感染実験を行い、研究計画1、2で得られた結果の再現性を確認する。

細胞内寄生菌は、感染する部位によって細胞質へ侵入する細菌（*L. monocytogenes*や*Shigella*属菌等）とファゴソーム内で生存する細菌（*Salmonella*属菌や*Mycobacterium*属菌）に大きく分けられる。IFN- γ 誘導性ゼノファジーが広く細胞内寄生菌の感染防御に関わるのかを調べるため、*L. monocytogenes*同様に*S. flexneri*や*S. enterica* serovar Typhimurium、*M. bovis* BCGを用いた感染実験を行う。以上の研究によりIFN- γ によるゼノファジーの活性化の分子メカニズムを考察した。

4) 研究が当初計画どおりに進まないときの対応

IFN- γ によるゼノファジーの活性化が未知のシグナル伝達経路によるものであった場合、上述の研究計画では詳細な分子メカニズムを解明出来ない可能性がある。その場合は以下の方法によりIFN- γ によるゼノファジーの活性化に関与する分子の同定を試みる。未処理もしくはIFN- γ 処理RAW264.7細胞に*L. monocytogenes*を感染させた後、ショ糖濃度密度勾配遠心法により細菌を含むファゴソームを精製し、質量分析法によりファゴソームに含まれるタンパク質を同定後、IFN- γ 処理細胞でのみ検出される分子を明らかにする。同定されたタンパク質の発現をノックダウンした細胞を用いて感染実験を行い、IFN- γ によるゼノファジー活性化に関与するかどうかを

調べる。また、同定されたタンパク質がオートファジー関連因子と複合体を形成しているかどうかを免疫沈降法で調べる。以上の研究結果から IFN- γ によるゼノファジーの活性化の分子メカニズムを明らかにした。

4. 研究成果

病原体が生体内に侵入した場合、病原体と直接戦うのはマクロファージを代表とする食細胞であり、マクロファージによる免疫作用はすべての動物に普遍的に必須の生体防御機構である。一方、細胞内寄生菌は、通常の殺菌作用を回避しマクロファージ内で生存・増殖する。このような細胞内寄生菌に対する感染防御には、マクロファージ自身の感染防御機構である細胞自律的自然免疫 (cell autonomous innate immunity) の強化が重要である。インターフェロン (IFN- γ) はマクロファージの主要なアクチベーターであり、細胞内寄生菌に対する細胞自律的自然免疫を活性化する。IFN- γ のマクロファージ活性化作用は自然免疫システムにおいて重要なステップである。

これまでに我々の研究グループでは、宿主細胞の自己成分分解システムであるオートファジーが IFN- γ 誘導性の細胞自律的自然免疫に関与する事を明らかにしている。本研究において、*Listeria monocytogenes* に対する IFN- γ 誘導性オートファジーの特徴を調べたところ、この作用に Atg5 や、Atg7、Beclin 1 は関与するが、ULK1 は関与しない事が、ノックダウン細胞を用いた解析で明らかになった。さらに光・電子相関顕微鏡解析にて *L. monocytogenes* を取り囲むオートファゴソーム膜が一重膜である事が明らかになった。これらの表現型は、LC3 associated phagocytosis (LAP) の特徴と一致することから、IFN- γ 刺激マクロファージで LAP が活性化すると考えられた。LAP は、近年、自然免疫に関与する事が明らかにされつつあるが、その生物学的意義など不明な点が多く残されている。今後は、さらに IFN- γ 誘導性 LAP を詳細に解析し、マクロファージの細胞内寄生菌に対する細胞自律的自然免疫の全貌解明を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計5件)

松澤健志

LC3 associated phagocytosis (LAP) はインターフェロン 誘導性細胞自律的自然免疫に関与する
第 90 回日本細菌学会総会、2017 年

瀬川晶子、熊谷恒平、谷浩行、松澤健志

イヌインターフェロン γ のマクロファージを介した細菌感染防御メカニズムの解明
第 90 回日本細菌学会総会、2017 年

瀬川晶子、松澤健志

RAW 264.7 マクロファージ様細胞株を用いた黄色ブドウ球菌感染実験の確立
第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年

松澤健志

Interferon gamma facilitates autolysosome formation in macrophages
第 89 回日本細菌学会総会、2016 年

瀬川晶子、熊谷恒平、谷浩行、松澤健志

イヌインターフェロン γ のマクロファージを介した感染防御メカニズムの解明
第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。