

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11039

研究課題名(和文) オートファジーを介した黄色ブドウ球菌排除の分子基盤解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis of *Staphylococcus aureus* exclusion via autophagy

研究代表者

原田 佳枝 (HARADA, Kae)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：60432663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PRIP (PLC-related catalytically inactive protein) を介したオートファジーによる細菌増殖調節の分子メカニズム解明が目的の研究である。マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) にサルモネラ菌感染モデルを用いた結果、オートファゴソーム (SCVs) 内の細菌数は、Pripノックアウト (Prip-KO) MEF で野生型よりも増加していた。さらに、SCVのautophagic flux は、Prip-KOで野生型よりも抑制されていた。以上より、PRIPはSCVの成熟を促進させる分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an intrinsic host defense system that recognizes and eliminates invading bacterial pathogens. We have identified microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), a marker protein of autophagy, as a binding partner of phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP). To disclose the molecular mechanisms of bacterial elimination by autophagic pathway, we here examined by using a *Salmonella* Typhimurium infection assay. In mouse embryonic fibroblasts (MEFs) infected with *Salmonella*, the number of intracellular *Salmonella* and *Salmonella* in LC3-positive autophagosome-like vacuoles (SCVs: *Salmonella* containing vacuoles) were both increased in Prip-knockout (KO) MEFs. In addition, we analyzed autophagic flux, and autophagic flux in Prip-KO MEFs was impaired. Altogether, impaired acidification in SCVs of Prip-KO MEFs may induce abnormality in antibacterial autophagy, resulting in remarkable *Salmonella* proliferation.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

細胞内分解系であるオートファジーは、細胞からエネルギー基質を取り出したり、細胞内の不要タンパク質を分解する等、様々な細胞機能を制御するシステムである。最近、細胞内に侵入した細菌がオートファジーによって排除されるとして注目されてきている。研究代表者は、オートファジーにより細胞内に侵入した黄色ブドウ球菌が、PRIP (PLC-related catalytically inactive protein) によって制御されることを明らかにした (Harada-Hada et al., 2014)。しかし、この現象が他の細菌でも同様に生じるかどうかは不明であり、さらにその分子メカニズムは不明な点が多く、解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究では、PRIP と細菌排除特異的な分子が協同する新たな分子基盤の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

タンパク質やイノシトールリン脂質等の細胞内局在の検出には免疫染色法を用いるのが一般的である。しかし、黄色ブドウ球菌を感染させた細胞では、細菌上の毒素が非特異的に反応して陽性シグナルが発生するため困難である。そこで今回は黄色ブドウ球菌と同じく細胞内に侵入する特徴を持つ *Salmonella Typhimurium* を用いてさらに研究を進めた。

PRIP ノックアウト (Prip-KO) マウスより胎児繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) を調整し MEF にサルモネラを感染させてオートファゴソームにマーカータンパク質である LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) の抗体で免疫染色、DAPI で細菌 DNA の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察で LC3 陽性 *Salmonella* containing vacuoles (SCVs) を検出した。さらに、RFP-GFP-LC3 の GFP の pH 感受性を利用して Prip-KO 細胞のオートファゴソーム成熟を検討した。MEF にサルモネラを感染させ成熟して pH が低下した SCVs (GFP+/RFP-) と未成熟 SCVs (GFP+/RFP+) に含まれる細菌数を測定し、1 細胞あたりで SCVs に含まれるサルモネラのなかで、何%が成熟 SCVs であるか計算し比較した。

4. 研究成果

既存研究 (Harada-Hada et al., 2014) において、細胞内に侵入した黄色ブドウ球菌は、一旦オートファゴソームにより被覆され排除を受けるが、PRIP ノックアウト (Prip-KO) 細胞では、形成されたオートファゴソームが成熟せず細菌排除機能が低下しているという結果であった。

サルモネラにおいても Prip-KO 細胞では、

細胞内菌数、LC3 陽性 SCVs 内菌数ともに、野生型に比べて増加していた。また、サルモネラ感染時の Prip-KO 細胞では、SCVs における RFP-GFP-LC3 の GFP シグナル消失が野生型よりも減少したことから、autophagic flux が抑制されていることが分かった。

そこで我々はオートファゴソーム成熟にかかわる分子ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) に着目し調べたところ、Prip-KO 細胞では SCVs 上の PI3P が蓄積していることが分かった。さらに初期のオートファゴソーム上に出現し、PI3P と結合する分子である DFPC1 を用いて黄色ブドウ球菌感染実験を行った。その結果、Prip-KO 細胞では DFPC1 陽性の LC3 陽性細菌数が増加し、黄色ブドウ球菌においてもオートファゴソーム上での PI3P 代謝の変調が示唆された。

以上より Prip-KO 細胞では、細菌感染時のオートファゴソーム成熟に伴う酸性化が抑制され、オートファゴソーム上の PI3P が蓄積し、細菌排除能が低下していた。その結果、細胞内の細菌増殖が促進していることが示唆された。これにより、PRIP が細胞内の細菌増殖を調節する分子である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](計 10 件)

1. Hayashiuchi M, Kitayama T, Morita K, Yamawaki Y, Oue K, Yoshinaka T, Asano S, Harada K, Kang Y, Hirata M, Irifune M, Okada M, Kanematsu T, General anesthetic actions on GABAA receptors in vivo are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice. *J Anesth.*, 31(4):531-538, 2017. 査読あり

2. Yamawaki Y, Oue K, Shirawachi S, Asano S, Harada K, Kanematsu T, Phospholipase C-related catalytically inactive protein can regulate obesity, a state of peripheral inflammation., *Jpn Dent Sci Rev.*, 53(1):18-24, 2017. 査読あり

3. Asano S, Taniguchi Y, Yamawaki Y, Gao J, Harada K, Takeuchi H, Hirata M, Kanematsu T, Suppression of cell migration by phospholipase C-related catalytically inactive protein-dependent modulation of PI3K signalling., *Sci Rep.*;7(1):5408, 2017. 査読あり

4. Harada-Hada K, Mimura S, Hong G, Hashida T, Abekura H, Murata H, Nishimura M, Nikawa H., Accelerating effects of cellulase in the removal of denture adhesives from acrylic denture bases., *J Prosthodont Res.*, 61(2):185-192,

2017. 査読あり

5 . **Harada-Hada K**, Hong G, Abekura H, Murata H., Evaluation of the efficiency of denture cleaners for removing denture adhesives., Gerodontology, 33(4):453-460, 2016. 査読あり

6 . Oue K, Zhang J, **Harada-Hada K**, Asano S, Yamawaki Y, Hayashiuchi M, Furusho H, Takata T, Irifune M, Hirata M, **Kanematsu T**. Phospholipase C-related catalytically inactive protein is a new modulator of thermogenesis promoted by β -adrenergic receptors in brown adipocytes, J Biol Chem., 291(8): 4185-4196, 2016. 査読あり

8 . **原田佳枝**, 兼松隆: オートファジーによる細菌排除システム . 広島歯科医学雑誌 , 43:1-7 , 2016 .

9 . **Harada-Hada K**, and **Kanematsu T**, Molecular Basis Involved in Autophagy-Mediated Clearance of Intracellular Pathogens., Proc. 6th Hiroshima Conf. Educ. Sci. Dent., 2015, 99~101, 2015.

10 . 脱リン酸化制御による脂肪分解の新たな分子基盤 . 大植香奈, **原田佳枝**, 兼松隆. 日本薬理学会誌 . 146 , 93-97 , 2015.

〔学会発表〕(計 11件)

1 . **原田佳枝**, 三村純代, 洪 光, 二川浩樹, 西村正宏: 義歯安定剤ユーザーに適した新しい義歯洗浄剤開発の試み, 第10回日本義歯ケア学会学術大会(徳島), 2018 .

2 . **原田佳枝**, 三村純代, 洪 光, 安部倉 仁, 二川浩樹, 西村正宏: 義歯安定剤使用者のための新しい義歯洗浄剤の開発 . 公益社団法人日本補綴歯科学会第126回学術大会(横浜), 2017 .

3 . 末廣史雄, 藤島 慶, 益崎与泰, **原田佳枝**, 柳澤嵩大, 西村正宏: 顎骨再生を目的とした顎骨骨髓間質細胞培養法の開発 . 公益社団法人日本補綴歯科学会第126回学術大会(横浜), 2017 .

4 . 下田平 直大, 末廣史雄, 藤島 慶, **原田佳枝**, 益崎与泰, 西 恭宏, 西村正宏: 口腔インプラント専門外来におけるインプラントオーバーデンチャーの経過報告について . 第34回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会(熊本), 2017 .

5 . **原田佳枝**: 義歯安定剤使用者のための新規義歯ケア法の開発 . 2補綴OB会(鹿児島), 2016 .

6 . 末廣史雄, 益崎与泰, **原田佳枝**, 柳澤嵩

大, 西村正宏: 顎骨増生を目的とした低侵襲・効率的な顎骨骨髓間質細胞培養法の開発 . 平成28年度日本補綴歯科学会九州支部, 中国・四国支部合同学術大会(熊本), 2016 .

7 . **原田佳枝**, 三村純代, 洪 光, 橋田竜関, 安倍倉 仁, 村田比呂司, 二川浩樹, 西村正宏: アクリルレジン床に付着した義歯安定剤除去におけるセルラーゼの有用性 . 平成28年度日本補綴歯科学会九州支部, 中国・四国支部合同学術大会(熊本), 2016 .

8 . **Harada-Hada K** and **Kanematsu T**: Intracellular growth of Salmonella Typhimurium is inhibited by autophagic regulation of PLC-related catalytically inactive protein, The 57th Annual Meetings of Japanese Association for Oral Biology (Niigata), 2016.

9 . **Harada-Hada K** and **Kanematsu T**, Salmonella Typhimurium enclosed in p62/LC3-positive vacuoles is increased in Prip-knockout cells. 第48回広島大学歯学会総会(広島), 2015 .

10 . **Harada-Hada K** and **Kanematsu T**: Molecular Basis Involved in Autophagy-mediated clearance of intracellular pathogens. 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (Hiroshima), 2015.

11 . PRIP は non-professional phagocytes においてオートファジーによる感染細菌排除機構を抑制する . **原田佳枝**, 兼松隆. Biochemistry and Molecular Biology 2015 (神戸), 2015 .

〔図書〕(計 1件)

1 . 原田佳奈, **原田佳枝**, 兼松隆: オートファジー系を介した黄色ブドウ球菌排除機構における PRIP の役割解明 . Japanese Society for Proteases in Pathophysiology News Letter , No.35 , 22-23 , 2015 .

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 義歯安定剤の除去剤及び除去方法
発明者: **原田佳枝**, 三村純代, 二川浩樹
権利者: 国立大学法人広島大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-012907
出願年月日: 2016年1月27日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

広島大学大学院医歯学総合研究科総合研究
院 細胞分子薬理学
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/shiyaku/>

鹿児島大学大学院医歯薬保健学研究院 口
腔顎顔面補綴学分野
[http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/
prostho2/index.htm](http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/prostho2/index.htm)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 佳枝 (HARADA KAE)
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 助教

研究者番号 : 60432663

(2)研究分担者

兼松 隆 (広島大学)
広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究者番号 : 10264053