

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08800

研究課題名(和文)肺炎球菌の病原因子・宿主応答に関する分子基盤と次世代肺炎球菌ワクチン開発への展開

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism concerning pneumococci-host interaction targeting for development for next-generation pneumococcal vaccine

研究代表者

小川 道永 (OGAWA, MICHINAGA)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：80361624

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)：本研究では肺炎球菌に対する新規治療法開発を目指し、肺炎球菌の病原因子と宿主因子との相互作用に焦点を当て解析を行った。その結果、感染1時間後にはFIP200非依存的なLAPosome (LC3-associated phagosomes) 様 vesicle (PcLV) が一過性に誘導され、感染2時間後にはFIP200依存的な殺菌的なオートファジー (PcAV) が誘導されること、PcAV誘導はPcLVに依存すること、PcLV誘導はp62、NDP52、Atg16L1 WDドメインを必要とし、PcAV誘導はp62、Rab41、Nedd4-1によるK63型Ub鎖形成を必要とすることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌は鼻咽頭に常在し、小児や高齢者では菌血症・髄膜炎といった致死性の高い侵襲性肺炎球菌感染症を引き起こす。近年、血清型交代によるワクチンが効かない血清型の肺炎球菌や、多剤耐性肺炎球菌の分離例が増加しており、新規治療法の開発が喫緊の課題である。本研究により、一次バリアである粘膜上皮細胞内での感染成立に必要な病原因子、菌の排除に必要な宿主細胞内での膜輸送系、さらには菌と宿主細胞との相互作用の一端が明らかとなり、新規治療法開発の標的分子探索に必要な基礎的な知見を多く得ることが出来た。今後、本研究をさらに発展させ、肺炎球菌と宿主との相互作用全体を俯瞰するモデルを構築していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a new therapeutic method against *Streptococcus pneumoniae*, and conducted an analysis focusing on the interaction between pneumococcal virulence factor and the host factor. As a result, FIP200-independent LAPosome (LC3-associated phagosomes)-like vesicles (PcLV) were transiently induced after 1 h of infection, and FIP200-dependent bactericidal autophagy (PcAV) was subsequently occurred after 2 h of infection. Furthermore, it was revealed that PcLV induction is prerequisite for PcAV induction, PcLV induction requires p62, NDP52, and Atg16L1 WD domain, and PcAV induction requires p62, Golgi-localized Rab41, and K63-linked poly-Ub chain formation by Nedd4-1.

研究分野：病原細菌学、細胞生物学、感染生物学

キーワード：肺炎球菌 オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は小児の中耳炎や咽頭炎などからしばしば分離され、健康者では鼻腔、咽頭など上気道部に常在する日和見感染菌である。小児や免疫力が低下した高齢者では敗血症、髄膜炎など侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) を引き起こす。日本では高齢者・小児ともにワクチンが定期接種化され、一定の予防効果を上げている。その一方で、ワクチン定期接種化により、血清型交代が加速し既存のワクチンが効かない血清型の肺炎球菌が増加している。さらに、臨床分離される肺炎球菌の 50%以上がペニシリン耐性であることと、多剤耐性肺炎球菌の出現が報告されていることから、血清型に依存しない次世代肺炎球菌ワクチン、および新規予防法・治療法の開発が急務である。

2. 研究の目的

次世代肺炎球菌治療法の開発に必要な標的分子を探索するためには、肺炎球菌感染過程における病原因子と宿主因子との相互作用について分子レベルで解析することが必要となる。そこで、我々は細胞内に侵入した肺炎球菌と宿主細胞内殺菌機構との相互作用について、オートファジー着目して解析を行っている。現在までに、肺炎球菌感染細胞においてオートファジーの特異的マーカー分子である LC3 が菌体周囲に集積することを見いだしていることから、本研究では肺炎球菌感染細胞におけるオートファジー誘導の意義を明らかにするとともに、肺炎球菌を標的とするオートファジーの誘導機構について、菌側 (病原因子)、宿主側、双方から解析を行い、細胞内に侵入した肺炎球菌と宿主細胞との相互作用を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 宿主細胞内に侵入した肺炎球菌と宿主因子との共局在性解析

宿主因子発現用ベクターをトランスフェクションした MEF 細胞 (マウス胎児繊維芽細胞) に肺炎球菌を $\text{moi}=100$ で感染させ、1,000 rpm、5 min、室温で遠心後、5% CO_2 存在下、37°C で 60 分間培養した。PBS で 2 回洗浄後、200 γ のゲンタマイシンを添加した DMEM/10% FCS 培地を加え 30 分間処理し細胞外の菌を殺菌した後、100 γ のゲンタマイシンを添加した DMEM/10% FCS 培地に交換後、5% CO_2 存在下、37°C でさらに 1 または 2 時間培養した。培養後、4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液を用いて室温で 30 分間固定後に PBS で 3 回洗浄し、蛍光免疫染色を行った後に、共焦点レーザー顕微鏡による観察に供した。

(2) 肺炎球菌の各病原因子欠失変異株の細胞内生残性の検討

MEF 細胞に肺炎球菌を $\text{moi}=100$ で感染させ、1,000 rpm、5 min、室温で遠心後、5% CO_2 存在下、37°C で 60 分間培養した。PBS で 2 回洗浄後、200 γ ゲンタマイシン/DMEM/10% FCS で 15 分、さらに 1 γ ペニシリン/200 γ ゲンタマイシン/DMEM/10% FCS で 15 分処理し細胞外の菌を殺菌した。その後、PBS で 3 回洗浄し抗生物質を除去した後に 1% サポニン/PBS で細胞を可溶化し、段階希釈した細胞抽出液を THY プレートに塗布し、cfu (colony forming unit) により侵入菌数を求めた。経時的な細胞内菌数測定は、上述の通り感染と細胞外の菌の殺菌を行った後に、PBS で 3 回洗浄し、DMEM/10% FCS に交換後、5% CO_2 存在下、37°C でさらに一定時間培養した。各タイムポイントで細胞を可溶化し、段階希釈した細胞抽出液を THY プレートに塗布し、cfu により生残菌数を求めた。菌の生残性は侵入菌数に対する各タイムポイントでの生菌数の相対値で算出した。

4. 研究成果

(1) 感染2時間後に誘導される肺炎球菌を標的とするオートファジー (PcAV) 誘導機構解析

本研究では、感染2時間後に誘導される肺炎球菌を標的とするオートファジー(PcAV)と PcAV 誘導に必要な病原因子の探索を行った。オートファジーマーカーである GFP-LC3 または mCherry-LC3 を安定発現させた BHK、MEF、Detroit 562 細胞に肺炎球菌 R6 株または TIGR4 株を2時間感染させた結果、肺炎球菌を内包する膜小胞 (PcV) に LC3 が高頻度に集積することが明らかになった。そこで、透過型電子顕微鏡による観察を行った結果、この小胞はオートファジーに特有の2重膜であることが明らかになった。

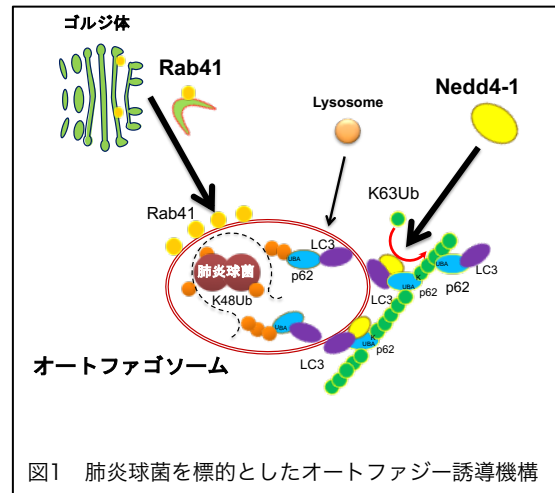


図1 肺炎球菌を標的としたオートファジー誘導機構

さらに、オートファジー不全細胞である ATG5 KO MEF では LC3 の PcV への集積が完全に阻害され、肺炎球菌の殺菌も抑制されたことから、肺炎球菌感染2時間後に観察される LC3 陽性の PcV は殺菌性のオートファゴソーム (PcAV : pneumococci-containing autophagic vesicles) であることが明らかとなった。病原細菌の保有する膜孔形成毒素はエンドソームに損傷を与え、選択的オートファジーの引き金になることが知られている。そこで、肺炎球菌の保有する膜孔形成毒素である PLY (ニューモリシン) を欠失させた肺炎球菌 R6 株を野生株と共に MEF に感染させた結果、PcAV の誘導は完全に抑制された。次に、PcAV 誘導に必要な宿主因子を (1) カノニカルオートファジー関連因子と (2) 選択的オートファジーの受容体に焦点を絞り解析した結果、PcAV は FIP200、ULK1/2、Atg5、Atg 7、Atg 14、Atg 16L1 を必要とするカノニカルなオートファジーであり、さらに poly-Ub-p62/SQSTM1-LC3 オートファジー受容体が PcAV の誘導に関与することが明らかとなった。さらに、PcAV 誘導に関与する Rab タンパク質と E3 リガーゼの探索をおこなった結果、ゴルジ体に局在する Rab41 と、K63 型ユビキチン鎖形成に関与する Nedd4-1 が PcAV 誘導に必要であることが明らかとなった (引用文献1)。

(2) 感染初期に一過性に誘導される LC3 陽性エンドソーム (PcLV) の誘導機構解析

FIP200 非依存的に誘導されるノンカノニカルオートファジーである LAP (LC3-associated phagocytosis) に焦点をあてて解析を行った。FIP200 ノックアウトマウス由来の MEF 細胞に肺炎球菌を感染させ、ノンカノニカルオートファジー誘導解析を行った結果、感染1時間後に一過性に LAP 様構造 (PcLV: pneumococci-containing LAP) が誘導されることが明らかになった。そこで、透過型電子顕微鏡による観察を行った結果、この小胞は LAP に特有の1重膜であることが明らかになった。次に、貪食細胞における LAP 誘導に必要であることが報告されている PI3P、NADPH oxidase 由来の ROS、および TLR2 が肺炎球菌誘導性の PcLV 誘導に必要なかどうかを調べた結果、いずれも PcLV 誘導には必要ないことが明らかになり、LAP と PcLV

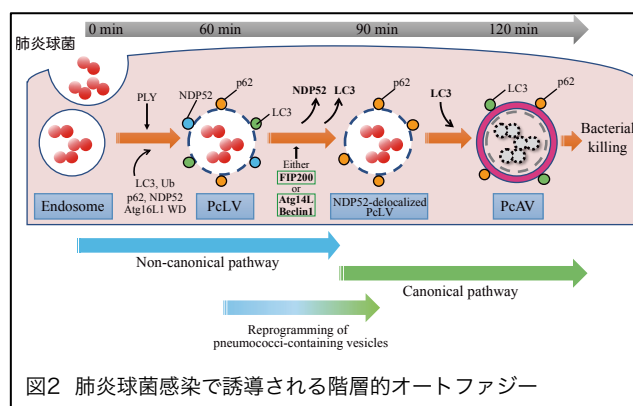


図2 肺炎球菌感染で誘導される階層的オートファジー

は異なる誘導機構を持つことが明らかになった。肺炎球菌感染2時間後に観察される LC3 陽性の PcV は殺菌性のオートファゴソーム (PcAV : pneumococci-containing autophagic vesicles) であることが明らかとなった。病原細菌の保有する膜孔形成毒素はエンドソームに損傷を与え、選択的オートファジーの引き金になることが知られている。そこで、肺炎球菌の保有する膜孔形成毒素である PLY (ニューモリシン) を欠失させた肺炎球菌 R6 株を野生株と共に MEF に感染させた結果、PcAV の誘導は完全に抑制された。次に、PcAV 誘導に必要な宿主因子を (1) カノニカルオートファジー関連因子と (2) 選択的オートファジーの受容体に焦点を絞り解析した結果、PcAV は FIP200、ULK1/2、Atg5、Atg 7、Atg 14、Atg 16L1 を必要とするカノニカルなオートファジーであり、さらに poly-Ub-p62/SQSTM1-LC3 オートファジー受容体が PcAV の誘導に関与することが明らかとなった。さらに、PcAV 誘導に関与する Rab タンパク質と E3 リガーゼの探索をおこなった結果、ゴルジ体に局在する Rab41 と、K63 型ユビキチン鎖形成に関与する Nedd4-1 が PcAV 誘導に必要であることが明らかとなった (引用文献1)。

の誘導メカニズムは異なることが明らかとなった。LAPにおける先行研究から、C末のWD領域を欠失させたAtg16L1で相補したAtg16L1 KO MEFではオートファジーは正常に起きるにも関わらずLAP形成が不全になることが知られていたことから、我々もAtg16L1 KO MEF/Atg16L1 ΔWDを作製しPcLV誘導性を解析した結果、貪食細胞でPI3P、ROS、TLR2依存的に誘導されるLAP同様にPcLV誘導も阻害されることが明らかになった。このことは、FIP200非依存的に誘導されるLAP様vesicleが多様性を持つとともに類似性も持つことを示していた。さらに、興味深いことに、Atg16L1 KO MEF/Atg16 ΔWDではカノニカルなオートファジーは阻害されなかったにもかかわらず、感染2時間後に誘導されるカノニカルなオートファジーであるPcAVが完全に阻害されていた。この結果から、感染2時間後に誘導されるPcAV誘導は、感染1時間後に一過性に誘導されるPcLVに依存することが明らかとなった。さらに、興味深いことに、PcLV同様にNDP52も感染1時間後に一過性に出現し消失することを見いだしたことから、NDP52をマーカーとして用いて肺炎球菌を内包する膜小胞(PcV)の動態を経時的に観察した結果、肺炎球菌誘導性オートファジーは、PcLVとPcAVとその間にAtg14依存的に誘導されるNDP52⁻, LC3⁻, p62⁺ PcVの3層性であることが明らかとなった(引用文献2)。

<引用文献>

1. **Ogawa M**, Matsuda R, Takada N, Tomokiyo M, Yamamoto S, Shizukuishi S, Yamaji T, Yoshikawa Y, Yoshida M, Tanida I, Koike M, Murai M, Morita H, Takeyama H, Ryo A, Guan JL, Yamamoto M, Inoue JI, Yanagawa T, Fukuda M, Kawabe H, Ohnishi M. Molecular mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*-targeted autophagy via pneumolysin, Golgi-resident Rab41, and Nedd4-1 mediated K63-linked ubiquitination. **Cell Microbiol.** e12846 doi: 10.1111/cmi.12846. (2018)
2. **Ogawa M**, Takada N, Shizukuishi S, Tomokiyo M, Chang B, Yoshida M, Kakuta S, Tanida I, Ryo A, Guan JL, Takeyama H, Ohnishi M. *Streptococcus pneumoniae* triggers hierarchical autophagy through reprogramming of LAPosome-like vesicles via NDP52-delocalization. **Commun Biol.** 3:25. doi: 10.1038/s42003-020-0753-3. (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ogawa M, Matsuda R, Takada N, Tomokiyo M, Yamamoto S, Shizukushi S, Yamaji T, Yoshikawa Y, Yoshida M, Tanida I, Koike M, Murai M, Morita H, Takeyama H, Ryo A, Guan JL11, Yamamoto M, Inoue JI, Yanagawa T, Fukuda M, Kawabe H, Ohnishi M	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular mechanisms of Streptococcus pneumoniae-targeted autophagy via pneumolysin, Golgi-resident Rab41, and Nedd4-1-mediated K63-linked ubiquitination	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Microbiol	6. 最初と最後の頁 e12846 ~ e12846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.12846	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Hubber A, Kubori T, Coban C, Matsuzawa T, Ogawa M, Kawabata T, Yoshimori T, Nagai H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Bacterial secretion system skews the fate of Legionella-containing vacuoles towards LC3-associated phagocytosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 44795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep44795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishiumi, F., Ogawa, M., Nakura, Y., Hamada, Y., Nakayama, M., Mitobe, J., Sakai, N., Hiraide, A., Takeuchi, M., Yoshimori, T. and Yanagihara, I.	4. 巻 なし
2. 論文標題 Intracellular fate of Ureaplasma parvum entrapped by host cellular autophagy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbiol Open	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mbo3.441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa M, Takada N, Shizukuishi S, Tomokiyo M, Chang B, Yoshida M, Kakuta S, Tanida I, Ryo A, Guan JL, Takeyama H, Ohnishi M	4. 巻 3
2. 論文標題 Streptococcus pneumoniae triggers hierarchical autophagy through reprogramming of LAPosome-like vesicles via NDP52-delocalization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0753-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shizukuishi S, Ogawa M, Ryo A, Ohnishi M	4. 巻 16
2. 論文標題 The multi-step mechanism and biological role of noncanonical autophagy targeting Streptococcus pneumoniae during the early stages of infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1152-1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1743937	査読の有無 有
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20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高田直輝、小川道永、大西真、竹山春子
2. 発表標題 Analysis of FIP200-independent autophagy induction mechanism in Streptococcus pneumoniae infected cells
3. 学会等名 5th Core-to-Core International Symposium "3D Lab-Exchange Program", OIST,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田直輝、小川道永、竹山春子、大西真
2. 発表標題 肺炎球菌に対するゼノファジー誘導の分子メカニズム解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田直輝、小川道永、山下裕顕、竹山春子、大西真
2. 発表標題 宿主細胞内における肺炎球菌殺菌機構の解析
3. 学会等名 第101回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 零石 早矢佳、小川 道永、松永 智子、梁 明秀、大西 真
2. 発表標題 宿主オートファジーを誘導する肺炎球菌病原因子の探索とその誘導機構解析
3. 学会等名 第101回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中井 友博、小川 道永、岡田 信彦、大西 真
2. 発表標題 肺炎球菌感染により惹起される炎症応答を制御する病原因子の探索
3. 学会等名 第101回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川道永、高田直輝、零石早矢佳、大西 真
2. 発表標題 Nedd4-1 を介した K63 型ユビキチン化による宿主細胞内肺炎球菌認識機構
3. 学会等名 第50回 レンサ球菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michinaga Ogawa, Naoki Takada, Sayaka Shizukuishi, Isei Tanida, Mitsunori Fukuda, Makoto Ohnishi
2. 発表標題 Molecular mechanisms of Streptococcus pneumoniae-targeted selective autophagy via Golgi-resident Rab41 and Nedd4-1 mediated K63-linked ubiquitination
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川 道永、松田 竜太、友清帝、村井 美代、大西 真
2. 発表標題 肺炎球菌に対する選択的オートファジーの分子機構
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田直輝、小川道永、大西真、竹山春子
2. 発表標題 宿主細胞内における肺炎球菌殺菌機構の解析
3. 学会等名 第100回日本細菌学会関東支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松田 竜太、小川 道永、村井 美代、大西 真
2. 発表標題 肺炎球菌に対する選択的オートファジーの分子メカニズム解析
3. 学会等名 第100回日本細菌学会関東支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川道永
2. 発表標題 宿主細胞内における肺炎球菌認識機構
3. 学会等名 第49回 レンサ球菌研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川道永
2. 発表標題 肺炎球菌と宿主細胞との相互作用に関する解析
3. 学会等名 第90回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 雲石早矢佳、小川道永、松永智子、梁明秀、大西 真
2. 発表標題 肺炎球菌の保有する病原因子によるオートファジー制御機構の解析
3. 学会等名 第51回 レンサ球菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川道永、高田直輝、竹山春子、大西真
2. 発表標題 肺炎球菌感染細胞におけるPcLAPの誘導メカニズム解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 雲石早矢佳、小川道永、松永 智子、梁 明秀、大西真
2. 発表標題 肺炎球菌の保有する病原因子によるオートファジー制御機構の解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 道永、零石 早矢佳、梁 明秀、大西 真
2. 発表標題 宿主細胞に侵入した肺炎球菌に対するLAP誘導機構の解析
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井 友博、小川 道永、岡田 信彦、大西 真
2. 発表標題 肺炎球菌感染により惹起される炎症応答を制御する病原因子の探索
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 零石 早矢佳、小川 道永、梁 明秀、大西 真
2. 発表標題 肺炎球菌感染細胞におけるLAPosome様小胞の誘導機構解析
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 零石 早矢佳、小川 道永、高田直輝、梁 明秀、大西 真
2. 発表標題 肺炎球菌感染細胞における LAPosome 様小胞の誘導機構解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 道永、大西 真
2. 発表標題 肺炎球菌感染における hierarchical なオートファジー誘導
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究トピックス https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/459-bacteriology/8010-bac-2018-001.html 肺炎球菌感染に対するマルチステップオートファジーによる波状攻撃 https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/bacteriology/9306-bac-2020-001.html</p>

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