

平成22年2月9日現在

研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19791339  
研究課題名（和文） オートファジーの形成を誘導する細胞内侵入性レンサ球菌認識機構の解析  
研究課題名（英文） Recognition mechanism of intracellular group A streptococci for autophagic degradation.  
研究代表者  
桜井 敦朗 (SAKURAI ATSUO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：90431759

研究成果の概要：非貪食細胞内に侵入したA群レンサ球菌(GAS)は、オートファゴソームに取り囲まれ、リソソームと融合して分解されるが、本研究では細胞内で病原微生物の表面構造物(PAMPs)を認識する因子であるNLRファミリー遺伝子のうち、オートファジーを誘導するNLRを見出した。また、炎症応答などとの関連など、宿主免疫におけるオートファジーの役割を明らかにした。さらに、オートファジーを強く誘導する菌体表層構造を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,000,000	0	2,000,000
平成20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：自然免疫・オートファジー・レンサ球菌

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジー（自食作用）は、細胞質内の小器官や巨大タンパク質を非特異的に分解する自己成分分解機構であり、飢餓状態で大幅に亢進して分解産物を生存の糧とし、アミノ酸レベルを保持するために機能する。もとは酵母で発見された機構ではあるが種々の生物でオートファジーは同定されており、特にほ乳類においては、飢餓応答のみならず異常タンパク質蓄積を伴う神経変性疾患、心筋症、免疫応答、肝機能の維持、細菌感染、

細胞死など多くの病態・現象に関与していることが明らかになっており、近年注目を集めている。我々のグループでもこれまでに非貪食細胞内に侵入したA群レンサ球菌(Group A streptococci; GAS)がオートファゴソームによって取り囲まれ、その後リソソームと融合して分解されることを報告した。

しかし、オートファジーに関与する遺伝子が明らかになる一方で、オートファジーの制御に関する研究はあまりすすんでいない。さ

らに、細菌感染の場合では、細菌がどのように細胞質内で異物として認識されているのかについては全く分かっていない。生体内で、侵入した細菌やウイルスなどの病原体に対し、リポ多糖やペプチドグリカンのような固有のパターンを認識し免疫応答を起こさせる因子として、NLR 遺伝子群がある。その機能は現在までのところ、NF- $\kappa$ B の活性化や抑制、アポトーシスの誘導といったところが報告されているのみであるが、本研究ではこの NLR 遺伝子群によって細菌が認識されることによりオートファジーの誘導、抑制が生じるのではないかと考え、レンサ球菌の代表種でもある GAS を用いて非貪食細胞におけるオートファジー形成のメカニズムに対する NLR 遺伝子の関与を解析するものである。

## 2. 研究の目的

GAS をはじめとする病原性細菌はエンドソームを介して宿主細胞内に侵入するが、電子顕微鏡を用いた形態学的な観察からはそのままエンドソーム内で消化されず細胞質内に脱出していると考えられる菌が認められる。そのことが我々のグループでエンドソームリソソーム系以外にもオートファジーによって細菌を除外する機構があることの解明につながったが、生理的狀態では細胞内にオートファゴソームはほとんど見当たらず、オートファジーの誘導は菌を認識する特異的な分子である NLR 遺伝子の一部によって、きわめて厳密に制御されていると考えている。また、細菌などが感染した際に起こる免疫応答としては NF- $\kappa$ B の活性化に代表される種々の炎症病態の発症、アポトーシス、そしてオートファジーの誘導が挙げられるが、これらの応答が感染の種類、程度によって互いに抑制、協調をおこなっているのではないかと推察している。オートファジーを誘導する遺伝子の解析後、アポトーシスや炎症応答を制御するタンパク質への影響についても検討する。このような内容の研究は現在までなされていない。

## 3. 研究の方法

本研究は概ね以下の手順で行った。

- nacht-LRR 遺伝子ノックダウン RNAi、過剰発現プラスミドの作製
- 細胞内侵入性細菌の細胞内での動態の評価
- GAS の細胞内侵入によるオートファジー誘導シグナル伝達系の解析
- 免疫応答としてのオートファジーと、NF- $\kappa$ B の活性化やアポトーシスとの関わり

細胞内には細菌やウイルスの表層構造のパターンを認識するとされる nacht-LRR 遺伝子群がファミリーを形成している。現在確認さ

れているこれらの遺伝子群について shRNA を設計しクローニングした。得られたプラスミドは HeLa 細胞やヒト単核球細胞(THP1)にトランスフェクションを行って発現抑制効率を確認した。トランスフェクションはリポフェクション法で行い、発現プラスミドと合わせて培地に加え 48 時間後に細胞の RNA を回収して reverse-transcription (RT)-PCR 法により発現の抑制を評価した。次に、レンサ球菌の代表種である GAS を用い、shRNA 導入 HeLa 細胞への感染を行った。オートファジー誘導を観察するため、オートファゴソームの膜マーカーである Light chain 3 (LC3) に、緑色蛍光タンパク質 EGFP を付した融合タンパク質 (EGFP-LC3) の発現系を用いた。GAS 菌株としては主に JRS4 株を使用し、HeLa 細胞の培地に加えて 1 時間培養する。その後抗生物質を含む培地に交換して細胞内に侵入していない菌体を処理し、1<sup>h</sup>4 時間後に順次 HeLa 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定する。核酸の染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行いオートファゴソームの形成が認められる細胞の割合を算出した。

オートファジー誘導への関与が認められる NLR 遺伝子については、各ドメイン別の発現プラスミドを作製した。NLR 遺伝子は、おおまかに PYD または CARD, NACHT, LRR と呼ばれる 3 つのドメインからなるが、各断片を発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入し、GAS 感染時のオートファジー誘導を観察することで、最終的にオートファジーの形成を誘導するためのシグナル伝達経路を活性化させるドメインを明らかにした。

オートファジーの誘導促進時の NF- $\kappa$ B の活性化やアポトーシスといったほかの免疫応答への影響を検討した。非感染時、感染時において、オートファジー関連遺伝子の抑制、または過剰発現を行った際の炎症性サイトカイン IL-1, caspase-1, またアポトーシスに関与する caspase-3 の発現をウエスタンブロット法または ELISA 法で検出し、遺伝子導入を行っていない細胞と比較した。NF- $\kappa$ B の活性化については、遺伝子抑制・過剰発現のプラスミドとともにルシフェラーゼレポーター遺伝子を組み込んだ NF- $\kappa$ B 遺伝子を含むプラスミドを細胞に導入し、GAS 感染時のレポーター遺伝子活性の変化を比較した。また、GAS の菌株や感染量を変化させた場合の免疫応答で、オートファジー、NF- $\kappa$ B の活性化、アポトーシスのそれぞれの関与がどのように影響を受けるかを検討した。

## 4. 研究成果

JRS4 株の感染によって HeLa 細胞の約 60% でオートファジーが誘導され、細胞内の菌はオートファゴソーム膜に捕獲されリソソームとの融合によって分解された。しかし、グラ

ム陽性菌の菌体成分細胞内レセプターと目される NOD2 の shRNA 遺伝子導入細胞でも InsC 変異遺伝子を導入したドミナントネガティブ変異細胞でも GAS 感染時のオートファゴソーム形成率は変化しなかった。また、グラム陰性菌の菌体成分認識レセプターである Nod1 でも同様にオートファゴソーム形成には変化は認められず、GAS 感染によるオートファジーの誘導には NOD1, NOD2 は関与していないことが推測された。一方で Nalp4, Nalp10 を強発現した細胞では GAS 感染により約 80% の細胞でオートファジーが誘導され、PYD, LRR の各領域を欠失させたプラスミドでも同様の傾向が見られた。しかし、いずれかの遺伝子の NACHT 領域を欠失させたプラスミドではオートファゴソーム形成率が約 35% に減少し、NF- $\kappa$ B 活性は GAS 感染によって特に著しい上昇を示した。Nalp4, Nalp10 が NACHT ドメインを介して協調することにより、炎症誘導を抑制し、オートファジーの誘導に関わることを示唆している。また、オートファゴソームを形成する PAMPs について検討したところ、供試した菌体構造物を培地中に添加した場合は、オートファジーの誘導が認められなかった。一方、マイクロインジェクションにより細胞質内に直接導入した場合はペプチドグリカンや iE-DAP 結合蛍光ビーズを取り囲むオートファゴソームの形成が顕著に誘導された。しかし NOD2 で著明な炎症誘導を引き起こす MDP ではオートファジーの誘導は認められなかった。

#### 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 4 件)

1. N. Okahashi, N. Masanobu, A. Sakurai, T. Terao, T. Hoshino, M. Yamaguchi, R. Isoda, T. Sumitomo, K. Nakano, S. Kawabata, T. Ooshima.

Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion.

**Biochemical and Biophysical Research Communications.** 査読有. 391:1192-1196, 2010.

2. F. Maruyama, M. Kobata, K. Kurokawa, K. Nishida, A. Sakurai, K. Nakano, R. Nomura, S. Kawabata, T. Ooshima, K. Nakai, M. Hattori, S. Hamada, I. Nakagawa.

Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content.

**BMC genomics.** 査読有. 10: 358-378, 2009.

3. F. Maruyama, T. Nozawa, C. Aikawa, A. Sakurai, I. Nakagawa.

Cost effective DNA sequencing and template preparation from bacterial colonies and plasmids.

**Journal of bioscience and bioengineering.** 査読有. 107:471-473, 2009.

4. A. Sakurai, N. Okahashi, F. Maruyama, T. Ooshima, S. Hamada, I. Nakagawa.

*Streptococcus pyogenes* degrades extracellular matrix in chondrocytes via MMP-13.

**Biochemical and Biophysical Research Communications.** 査読有. 373:450-454, 2008.

[学会発表] (計 10 件)

1. 桜井敦朗, 岡橋暢夫, 中田匡宣, 寺尾豊, 丸山史人, 川端重忠, 大嶋隆.  
口腔領域レンサ球菌による宿主上皮細胞への付着侵入と炎症の誘導.  
第 18 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 2009 年 6 月 27 日. 福岡.

2. 桜井敦朗, 船尾純子, 小畑充彦, 大嶋隆.  
口腔レンサ球菌の宿主上皮細胞への付着侵入能と宿主免疫応答の解析.  
第 47 回日本小児歯科学会, 2009 年 5 月 15 日. 大阪.

3. 大野雅幸, 丸山史人, 相川知広, 野澤孝志, 桜井敦朗, 中川一路.  
A 群レンサ球菌の全ゲノム発現解析に基づく細胞内生存機構の解明.  
第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12 日. 名古屋.

4. 丸山史人, 仲野和彦, 大野雅幸, 桜井敦朗, 野澤孝志, 大嶋隆, 浜田茂幸, 中川一路.  
*Streptococcus mutans* および *S. pyogenes* ゲノム・トランスクリプトームからみた種分化機構の解明.  
第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12 日. 名古屋.

5. T. Nozawa, A. Sakurai, H. Mori, M. Ono, C. Aikawa, F. Maruyama and I. Nakagawa.  
細菌感染時特異的オートファジーを誘導する NLR ファミリーと相互作用する宿主因子の機能解析.  
第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12 日. 名古屋.

6. 丸山 史人, 大野 雅幸, 森 宏員, 相川

知広, 野澤 孝志, 桜井 敦朗, 中川一路.  
Streptococcus mutans および S. pyogenes  
ゲノム・トランスクリプトームからみた種分  
化機構の解明.  
第 3 回ゲノム微生物学会. 2009 年 3 月 5 日.  
東京.

7. Takashi Nozawa, Atsuo Sakurai, Hirokazu  
Mori, Masayuki Ono, Chihiro Aikawa, Fumito  
Maruyama and Ichiro Nakagawa.  
Identification of minimum structure of  
pathogen-associated molecular pattern and  
the recognition mechanism in autophagy  
induction against group A streptococci.  
The Awaji international forum on infection  
and immunity. 2008 年 9 月 8 日. 淡路市.

8. Masayuki Ono, Fumito Maruyama, Takashi  
Nozawa, Hirokazu Mori, Chihiro Aikawa,  
Atsuo Sakurai, and Ichiro Nakagawa.  
Group A Streptococcus transcriptome  
dynamics inside human cell reveals  
bacterial adaptation and survival against  
innate immune systems.  
The Awaji international forum on infection  
and immunity. 2008 年 9 月 8 日. 淡路市.

9. 丸山史人, 大野雅幸, 森宏員, 相川知広,  
野澤孝志, 桜井敦朗, 中川一路.  
比較ゲノム・トランスクリプトーム解析に基  
づく Streptococcus mutans および S.  
pyogenes ゲノム進化機能の解析.  
第 2 回細菌学・若手コロッセウム. 2008 年  
8 月 3 日. 神奈川県三浦郡.

10. A. Sakurai, I. Nakagawa, S. Hamada.  
Recognition mechanism of intracellular  
group A streptococci for autophagic  
degradation.  
XVII Lancefield International Symposium  
on Streptococci and Streptococcal  
Diseases. 2008 年 6 月 23 日. Porto Heli,  
Greece.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桜井 敦朗 (ATSUO SAKURAI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号 : 90431759