

機関番号：33403

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590440

研究課題名 (和文) リステリアの細胞内侵入依存的カスパーゼ 1 活性化の分子機序とオートファジーの関与

研究課題名 (英文) Bacterial internalization into cytosol-dependent caspase-1 activation in *Listeria*-infected murine macrophages

研究代表者

野村 卓正 (NOMURA TAKAMASA)

仁愛大学・人間生活学部・講師

研究者番号：40362529

研究成果の概要 (和文)：リステリア感染によって宿主食細胞 (マクロファージ) に誘導されるサイトカイン (IL-1 α / β) 応答の機序を解析した。リステリアの細胞質への侵入に伴って、菌体由来の DNA が細胞質内の異物認識受容体の一つである AIM2 によって認識され、ASC を含むインフラマソームが形成された結果、caspase-1 が活性化され IL-1 β の成熟化が引き起こされる。同時に、カルシウムシグナル経路も活性化されカルシウム依存性たんぱく質分解酵素であるカルパインが活性化され IL-1 α の成熟化が引き起こされると共に、成熟化した IL-1 α / β はオートファジー経路あるいは分泌リソソーム経路を介して細胞外に分泌されることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The mechanism of IL-1 α / β production from *Listeria monocytogenes*-infected macrophages was elucidated. *L. monocytogenes* internalized into cytoplasmic space was recognized by AIM2 which was a pattern recognition receptor of host cells. Formation of inflammasome containing ASC was induced and activated the caspase-1 resulting to maturation of IL-1 β . In addition, bacterial entry into cytoplasm also activated calcium signaling pathway. Calcium signals should activate a Calcium-dependent protease, calpain resulting to IL-1 α maturation and release of mature IL-1 α / β by autophagy or secretory lysosome pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：リステリア、カスパーゼ、オートファジー、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

細胞内寄生性を示すリステリアによる感染においてマクロファージが示すサイトカイン応答のうち、特に獲得免疫誘導に必須となる成熟型 IL-1/18 の産生機序として、①細胞外からのシグナルにより TLRs-MyD88 を介して IL-1/18 遺伝子の発現が誘導され

proIL-1/18 が細胞内に産生され、②リステリアの細胞質内侵入を感知する NLR 遺伝子の発現が誘導されると、③ASC を含むインフラマソームが形成され、④インフラマソームと基質である proIL-1/18 のタンパク複合体が、オートファゴソームに取り込まれリソソームと融合した後、⑤オートリソソーム内の内

容物が細胞外に排出される結果、細胞外に分泌される、という仮説が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、リステリア感染により発現誘導され、細胞質内に侵入したリステリアを感知して caspase-1 活性化およびオートファジーを誘導するインフラマソームを構成する NLR 因子を同定すると共に、オートファジー経路の IL-1/18 の成熟化および分泌への関与の検証をが主要な目的として解析を行う。

3. 研究の方法

(1) リステリア感染によって誘導される IL-1 α / β 産生におけるカルシウムシグナル経路の関与を、カルシウムシグナル阻害剤を用いて ELISA 法およびウエスタンブロット法で調べた。

(2) リステリア感染時に誘導される IL-1 α / β の成熟化及び細胞外分泌におけるインフラマソームの関与を、IL-1 α / β 産生が観察されないマクロファージ細胞株 (RAW264.7, J774.1) 及び ASC 欠損あるいは caspase-1 欠損マウス由来腹腔マクロファージを用いて調べた。

(3) オートファジー形成阻害時の IL-1 α / β 産生への影響を、各種酵素阻害剤を用いて ELISA 法およびウエスタンブロット法で調べた。IL-1 α / β の細胞外への分泌とオートファゴソーム内因子 (リソソーム酵素) の細胞外への分泌が関連しているかウエスタンブロット法で確認した。

4. 研究成果

(1) カルシウムシグナルによって活性化される calpain の阻害によって IL-1 α の成熟化および細胞外への分泌は抑制されたが、IL-1 β の産生には影響がなかった。一方、IL-1 α / β の細胞外への分泌はカルシウムシグナル阻害剤処理によって著明に減少したことから、細胞内に蓄積した IL-1 α / β が成熟化して細胞外へ分泌されるには、菌の細胞内侵入によって誘導されるカルシウムシグナル必要であることが明らかになった。Caspase-1 によって成熟化される IL-1 β の細胞外への分泌もカルシウムシグナルに依存していることから、カルシウムシグナルは calpain 活性化に伴う IL-1 α の成熟化のみならず、これら成熟化したサイトカインの細胞外への分泌にも関与していることが示唆された。

(2) リステリア感染によって細胞外への IL-1 α / β 分泌が誘導されない RAW264.7 マクロファージ細胞株では、細胞内異物認識受容体ファミリー分子の一つである ASC 分子の遺伝子発現が認められないことが RT-PCR 法によって明らかになった。さらに ASC 遺伝子あ

るいは caspase-1 遺伝子を欠損したマウス由来の腹腔マクロファージにおいてもリステリア感染時に IL-1 β の成熟化及び細胞外への分泌が観察されなかったことから、リステリア感染によって誘導される IL-1 β の成熟化および細胞外分泌には、インフラマソーム形成による caspase-1 活性化が関与していることが明らかになった。一方、ASC 欠損あるいは caspase-1 欠損マクロファージにおける IL-1 α の産生は野生型と同レベルであったことから、IL-1 α の成熟化には ASC を含むインフラマソーム形成は関与していないことが明らかになった。さらに、細胞質内に侵入したリステリア菌体を認識する細胞内異物認識受容体を、siRNA によるノックダウン系を用いて検索したところ、細菌 DNA を認識する AIM2 をノックダウンしたマクロファージでは IL-1 β の成熟化及び細胞外への分泌が抑制された。

これらの結果から、細胞質に侵入したリステリアが分裂あるいは分解される際に菌体外に漏出した菌の染色体 DNA が、AIM2 によって認識されることによってインフラマソーム形成が促進され caspase-1 が活性化されることが示唆された。

(4) リステリア感染によってオートファジーが誘導されるのか LC-3 活性化を指標に調べたところ、リステリア野生株が感染したマクロファージではオートファジーが誘導されるが、細胞質に侵入できない LL0 欠損株の感染では誘導されないことが明らかになった。このオートファジー誘導は、オートファジー経路を阻害する PI3K 阻害剤処理によって、リステリア感染で誘導される IL-1 α / β の成熟化及び細胞外への分泌が抑制された。さらに、リソソーム由来たんぱく質分解酵素であるカテプシン B および D の阻害によっても抑制されたことから、IL-1 α / β の細胞外への分泌には、オートファジー経路あるいは分泌リソソーム経路が関与しているという可能性が示唆された。

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. Tsuchiya K., Hara H., Kawamura I., Nomura T., Yamamoto T., Daim S., Dewamitta S. R., Shen Y., Fang R., and Mitsuyama M. Involvement of absent in melanoma2 in inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*.

- Journal of Immunology.
185(2):1186-1195. 2010.
2. Shen Y., Kawamura I. *, Nomura T., Tsuchiya K., Hara H., Dewamitta S. R., Sakai S., Qu H., Daim S., Yamamoto T., and Mitsuyama M. Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages. *Infection and Immunity* 78(6):2857-2867. 2010.
 3. Dewamitta S. R., Nomura T., Kawamura I., Hara T., Tsuchiya K., Kurenuma T., Shen Y., Daim S., Yamamoto T., Qu T., Sakai S., Xu Y., and Mitsuyama M. Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1 alpha secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 78(5):1884-1889. 2010.
 4. Hara H., Tsuchiya K., Nomura T., Kawamura I. *, Shoma S., and Mitsuyama M. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes* on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. *Journal of Immunology* 180(12):7859-7868. 2008.

[学会発表] (計 4 件)

1. 野村卓正、申 艶娜、土屋 晃介、原 英

樹、酒井 俊祐、屈 慧新、河村 伊久雄、光山 正雄 「マクロファージのリストテリア貪食能のTLR2による増幅」、『第20回日本生体防御学会総会』、東京、2009年7月25日

2. 野村卓正、申 艶娜、土屋 晃介、原 英樹、酒井 俊祐、屈 慧新、河村 伊久雄、光山 正雄 「TLR2 signal is required for effective phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by macrophages」、『第 82 回日本細菌学会総会』、名古屋、2009年3月12日

3. 野村卓正、土屋晃介、原 英樹、内山良介、河村伊久雄、光山正雄 「リストテリアの細胞内動態がIL-1・産生誘導に及ぼす影響」、『第81回日本細菌学会総会』、京都、2008年3月26日

4. 野村卓正、土屋晃介、原 英樹、内山良介、河村伊久雄、光山正雄 「リストテリアの細胞内動態がIL-1・産生誘導に及ぼす影響」、『第7回感染症沖縄フォーラム』、沖縄、2008年2月16日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
()

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：