

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15789

研究課題名(和文) Study the mechanism how Rab32/Rab38 positive lysosome related organelle is involved in bacteria suppression through macroautophagy and microautophagy in macrophage and mouse infectious model.

研究課題名(英文) Study the mechanism how Rab32/Rab38 positive lysosome related organelle is involved in bacteria suppression through macroautophagy and microautophagy in macrophage and mouse infectious model.

研究代表者

LU SHIOULING (Lu, Shiou-Ling)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80830083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：A群溶血性レンサ球菌は細胞質内に侵入し、マクロオートファジーに捕捉される。しかし、オートファゴソームに囲まれるGASは一部であり、大部分は細胞内で抑制されていた。私は、マクロファージでRab32/38が関与するリソソーム関連小器官(LRO)がリソソーム突出部のような構造を示し、マクロオートファジーとして認識される機構を発見した。2023年には、マクロファージおよび破骨細胞におけるRab32/38-LROの役割を示す論文を発表した。Rab32/38-LROが細胞内GASの大部分を取り囲み、マクロファージによるGAS除去に必要であり、マクロオートファジーを必要としない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

化膿レンサ球菌(Group A Streptococcus, GAS)は、猩紅熱や壊死性筋膜炎、レンサ球菌性敗血症候群など幅広い疾患を引き起こす病原体で、過去20年でその毒性和感染症状が増強している。特に、昨年2023年から日本国内で劇症型溶血性レンサ球菌感染症の増加が報告されている。現在、適切なワクチンが存在せず、GASの病原性メカニズムを理解することが急務である。GAS感染では、ほとんどの細菌は免疫細胞マクロファージによって除去される。本研究、マクロファージがGASを分解する一部詳細なメカニズムを解明し、劇症型疾患の発症を抑制すること、例えば、敗血症に対する治療法の開発にヒントを提供する。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are professional phagocytes that engulf bacteria into lysosomes for digestion. Group A Streptococcus (GAS) can evade into the cytoplasm and are captured by macroautophagy. However, I found that only a small portion of GAS was surrounded by autophagosomes, even though most of the GAS population was suppressed in cells. In macrophages, I observed that small GTPase Rab32/38-associated lysosome-related organelles (LROs) present a structure resembling lysosome protrusion, a lysosome wrapping mechanism (LWM) recognized as microautophagy. I contributed to the completion of two papers identifying the role of Rab32/38-LRO in macrophages and osteoclasts, published in 2023. Continuing this project, I discovered that Rab32/38-LROs surround most intracellular GAS and are required for GAS clearance in macrophages, independent of macroautophagy.

研究分野：細胞生物、細菌感染

キーワード：化膿レンサ球菌 マクロファージ Rab32 Rab38 microautophagy

1. 研究開始当初の背景

宿主細胞は細菌を除去するために、活性酸素種 (ROS)、一酸化窒素 (NO)、抗菌ペプチドなどを放出します。マクロファージは専門の食細胞として細菌を取り込み、リソソームに運んで分解します。この輸送には貪食とマクロオートファジーが関与しています。また、ミクロオートファジーも細胞質の細菌分解に寄与しています。マクロオートファジーの分子メカニズムは完全には解明されていませんが、細菌クリアランスにおけるミクロオートファジーの役割についてはほとんど報告がありません。この疑問を解明するためにプロジェクトを始めました。

Rab GTPase タンパク質、特に Rab32 と Rab38 は、マクロファージにおける大型リソソーム (リソソーム関連小器官、LRO) の機能に非常に重要です。Rab32 は非免疫細胞においてサルモネラ・チフス菌の増殖を抑制しますが、リソソーム分解における Rab32 と Rab38 の詳細なメカニズムはまだ明らかになっていません。

私は 20 年近く A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) を研究してきました。GAS は様々なヒト疾患の原因となる病原体であり、その毒性は強まる一方です。250 以上の血清型が存在し、有効なワクチンはまだありません。抗生物質耐性は大きな問題ではないものの、GAS は抗生物質を回避するために非免疫細胞に侵入します。上皮細胞における GAS のクリアランスにはマクロオートファジーが関与しており、Rab7、Rab9、Rab23 が GAS-LC3 陽性液胞 / オートファゴソームにリクルートされます。マクロファージでは、GAS の増殖はリソソームで抑制されますが、Rab32/38-LRO を介したマイクロオートファジーの役割はまだ不明です。

マクロオートファジーは GAS に対してよく研究されていますが、マイクロオートファジーの役割、特にリソソームより大きな標的に対する役割についてはあまり研究されていません。これらのオートファジー経路がマクロファージにおける GAS クリアランスにどのように寄与しているかを理解するためには、さらなる研究が必要です。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マクロファージにおいて、Rab32/Rab38 陽性リソソーム関連オルガネラが、マクロオートファジーとマイクロオートファジーを介して、A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) をどのように抑制するかを解明することです。

3. 研究の方法

私たちの研究室では、CRISPR-Cas9 システムを用いて、Rab32 と Rab38 のシングルおよびダブルノックアウトマウス (DKO マウス) を作製しました。マクロオートファジーおよびマイクロオートファジーを介した GAS クリアランス経路におけるこれらの役割を研究するために、これらのノックアウトマウスから骨髄を通してマクロファージを単離しました。また、Raw264.7 マクロファージ細胞株を用いて Rab32/38 DKO、Atg7 KO、あるいは FIP200 KO マクロファージを作製し、蛍光共焦点顕微鏡を用いて細菌殺傷活性や分子リクルートメントを観察しました。

4 . 研究成果

- (1) **Rab32 と Rab38 のリクルートメント**:マクロファージでは、Rab32 と Rab38 が GAS を含むリソソームに強くリクルートされることが確認されました。GAS が貪食によって取り込まれた後、LC3 に取り囲まれるのは一部の GAS のみであり、大部分の細菌は LC3 がリクルートされる前にリソソームに捕捉されることがわかりました。
- (2) **Rab32 と Rab38 の欠損によるリソソームの酸性度低下**:Rab32/Rab38 シングル KO およびダブル KO マウスを用いた研究で、Rab32/38 二重 KO マクロファージでは、野生型 (WT) 細胞に比べてリソトラッカー強度が低く、GAS を抑制する能力が低下していることが示されました。これは、Rab32 と Rab38 の欠損がリソソームの酸性度を低下させることを示唆しています。
- (3) **Rab32 および Rab38 の GAS 殺傷への必要性**:GAS 細胞内の生存率の結果、WT マクロファージでは感染後 6 時間で GAS の生存率が 10%にまで低下したのに対し、Rab32/38 DKO マクロファージでは GAS の生存率が 80%と高いままでした。これは、Rab32 および Rab38 がマクロファージにおける GAS の殺傷に必要であることを示しています。
- (4) **マクロファージ内での Rab32/Rab38、オルガネラ、GAS の局在**:細胞内 GAS の位置を、Rab32 と Rab38 が報告されているゴルジ体、小胞体、ミトコンドリアなどの小器官と比較して調べました。その結果、マクロファージではこれらのオルガネラのいずれも Rab32 や Rab38 の陽性染色を示さず、リソソームの半数以上が Rab32 陽性であることが確認されました。Rab32 は高発現している一方、Rab38 のタンパク質発現は低いことがわかりました。
- (5) **Rab32/38-LR0-GAS のマクロオートファジーとの関わり**:GAS-Rab32-リソソーム/LR0 における LC3 のリクルートが少ないことから、GAS の殺菌にはマクロオートファジーが必要ないと考えられました。その結果、マクロオートファジー欠損マクロファージ (ATG7 KO および FIP200 KO 細胞) では、GAS の増殖は WT マクロファージと比較してわずかしき変化しませんでした。
- (6) **Rab32/38 のリソソームへのリクルートメントとマクロオートファジー**:Rab32 と Rab38 は小胞輸送に関与しているが、Atg7 KO や FIP200 KO マクロファージでも GAS 存在するリソソームに強くリクルートされていました。これにより、2 つの独立した経路が存在することが示唆されました。
- (7) **ミクロオートファジーの部分的関与と細胞質 GAS の標的化**:ほとんどの GAS はリソソームに捕捉されますが、マクロファージ内にはガレクチン 3 陽性の GAS を含むファゴソームがいくつか見つかりました。GAS のごく一部は細胞質に脱出し、そこでマクロオートファジーの隔離膜によって、あるいはミクロオートファジーを通して LR0 のような大型リソソームによって直接食べられる可能性

があります。しかし、WT マクロファージとマクロオートファジー欠損マクロファージの間で、GAS の殺傷に差は見られませんでした。細胞質 GAS は、おそらく Rab32 のリクルートメントが関与し、LR0 を介してリソソームに取り込まれる可能性があります。CLEM 画像による細胞質 GAS の Rab32-LR0 による取り込みに関する明確なデータはまだ待たれます。

- (8) **Rab32/38 欠損による GAS 感染後のマクロファージの炎症反応:** Rab32/38 を欠損させると、マクロファージの炎症性サイトカインが減少することがわかりました。これは、自然免疫細胞としてのマクロファージの GAS 感染に対する反応を解析した結果です。
- (9) **GAS 感染マウスモデルにおける Rab32/38 の役割: 生存率と臓器への播種:** GAS 感染マウスモデルを用いた予備データでは、GAS 感染 WT マウスと Rab32/38-DKO マウスの生存率に有意差は見られませんでした。しかし、皮膚局所感染モデルでは、Rab32/38-DKO マウスの臓器への播種菌数が WT マウスよりも多いことが確認されました。
- (10) **結果結論:** Rab32 および Rab38 は、マクロファージにおける GAS のリソソームへのリクルートメントと殺菌作用、そして GAS 感染に対する全身的な免疫応答において重要な役割を果たしています。これらのタンパク質が GAS の抑制にどのように関与するかをさらに解明することが、今後の研究の課題となります。現在、ほとんどのデータは来年の出版に向けて準備中です。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Noda Kazuya, Lu Shiou-Ling, Chen Siyu, Tokuda Kanako, Li Yangjie, Hao Feike, Wada Yoh, Sun-Wada Ge-Hong, Murakami Shinya, Fukuda Mitsunori, Itoh Takashi, Noda Takeshi	4. 巻 299
2. 論文標題 Characterization of Rab32- and Rab38-positive lysosome-related organelles in osteoclasts and macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105191 ~ 105191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105191	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 Tokuda Kanako, Lu Shiou-Ling, Zhang Zidi, Kato Yumiko, Chen Siyu, Noda Kazuya, Hirose Katsutoshi, Usami Yu, Uzawa Narikazu, Murakami Shinya, Toyosawa Satoru, Fukuda Mitsunori, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Noda Takeshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Rab32 and Rab38 maintain bone homeostasis by regulating intracellular traffic in osteoclasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 223 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.23061	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 Tsai Chao-Yuan, Sakakibara Shuhei, Kuan Yu-Diao, Omori Hiroko, El Hussien Maruwa Ali, Okuzaki Daisuke, Lu Shiou-Ling, Noda Takeshi, Tabata Keisuke, Nakamura Shuhei, Yoshimori Tamotsu, Kikutani Hitoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Opposing roles of RUBCN isoforms in autophagy and memory B cell generation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Signaling	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) 10.1126/scisignal.ade3599	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 -
1. 著者名 Shiou-Ling Lu, 野田健司	4. 巻 67
2. 論文標題 血管内皮細胞増殖因子の新たな役割：殺菌作業増強効果の発見	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 4. 大阪大学歯学部雑誌	6. 最初と最後の頁 17-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Lu Shiou-Ling, Omori Hiroko, Zhou Yi, Lin Yee-Shin, Liu Ching-Chuan, Wu Jiunn-Jong, Noda Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 VEGF-Mediated Augmentation of Autophagic and Lysosomal Activity in Endothelial Cells Defends against Intracellular Streptococcus pyogenes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	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) 10.1128/mbio.01233-22	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 Lu Shiou-Ling, Noda Takeshi	4. 巻 1
2. 論文標題 VEGF (vascular endothelial growth factor) provides antimicrobial effects via autophagy and lysosomal empowerment in endothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy Reports	6. 最初と最後の頁 555 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/27694127.2022.2137755	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 -

1. 著者名 野田健司, Shiou-Ling Lu	4. 巻 1445
2. 論文標題 オートファジーは健康寿命に寄与するか?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 大阪歯科保険医新聞	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) なし	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Lu Shiou-Ling
2. 発表標題 Mitochondrial autophagy is carried out by microautophagy in macrophages.
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lu Shiou-Ling
2. 発表標題 Rab32 and Rab38 maintain bone homeostasis by regulating intracellular traffic in osteoclast
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lu Shiou-Ling
2. 発表標題 Mitochondrial autophagy is carried out by microautophagy in macrophages
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shiou-Ling Lu
2. 発表標題 Study of Rab32/Rab38-positive lysosome-related-organelle involved in GAS clearance in macrophage.
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium: Innate immunity in host-pathogen interactions. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiou-Ling Lu
2. 発表標題 VEGF-mediated augmentation of autophagic and lysosomal activity in endothelial cells defends against intracellular Streptococcus pyogenes.
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiou-Ling Lu
2. 発表標題 Mitochondrial autophagy is carried out by microautophagy in macrophages.
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lu Shiou-Ling
2. 発表標題 Rab32とRab38は酸加水分解酵素とV-ATPaseの細胞内輸送を制御することにより破骨細胞の機能を促進する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiou-Ling Lu
2. 発表標題 How Streptococcus pyogenes is (or is not) targeted by autophagy in blood vessel endothelial cells.
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lu Shiou-Ling
2. 発表標題 VEGF-mediated augmentation of autophagic and lysosomal activity in endothelial cells determines the severity of Streptococcus pyogenes infection.
3. 学会等名 WIA (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
その他の国・地域 (台湾)	長庚大学	国立成功大学		
米国	Indiana University Bloomington			