

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791762

研究課題名（和文）異なる細菌感染に対応した細胞応答機構の解明

研究課題名（英文）The research of the cell reaction to the different bacterial infection

研究代表者

古田 信道（FURUTA NOBUMICHI）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50452446

研究成果の概要（和文）：

GAS を内包したオートファゴソームである GcAV (GAS containing Autophagosome like Vacuole) とリソソームとの融合に必要なタンパク質として、細胞内小胞輸送に関与するとされている SNARE タンパク質群のうち VAMP8 と Vti1b を同定した。P.g.については細胞内のエンドサイトーシス経路を利用し、細胞内へと侵入する。一部の P.g.はリサイクリング経路を利用して細胞外へと脱出し他細胞へと再侵入を図る。

研究成果の概要（英文）：P. gingivalis are invaginated by gingival epithelial cells via the endocytic

pathway, and some intracellular bacteria are sorted to lytic compartments, including autolysosomes and late endosomes/lysosomes, while a considerable number of the remaining organisms are sorted to

recycling endosomes, followed by bacterial exit from the cells. Exited bacteria can re-enter fresh cells.

This result strongly suggests that the recycling pathway is exploited by gingivalis to exit from infected cells to neighbouring cells as intracellular P. a mechanism of cell-to-cell spreading. Knockdown of the

combinational SNARE proteins Vti1b and VAMP8 with siRNAs disturbs the fusion of GcAV (GAS

containing Autophagosome like Vacuole) with lysosome. This finding indicates that VAMP8 and Vti1b

mediate fusion with lysosomes in antimicrobial autophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内は細胞内小器官によって満た

されている。このため各小器官同士が連携し、特定のタンパク質や脂質を積極的にやり取

りする物流機構が細胞の機能や形態維持にとって必須である。この物質輸送機構はメンブレントラフィックと呼ばれ、細胞間シグナル伝達や極性形成維持などの機能を担っている。この機構の破綻は、細胞癌化に代表される細胞機能異常の一因となる。メンブレントラフィックの主要な経路の一つが、エンドサイトーシス経路である。エンドサイトーシスは細胞膜上の多種多様な因子を介し、細胞の機能維持に必要な細胞外因子を細胞内へと取り込む。

しかしながら、エンドサイトーシスは細胞の機能維持に必須な因子だけではなく、細胞に対し、悪影響を及ぼす病原性細菌や細菌が分泌する菌体外毒素をも取り込んでしまう。このように病原細菌にとってエンドサイトーシスは宿主細胞内に侵入するために都合の良い機能であり、多くの重篤な感染症の原因菌（赤痢菌、サルモネラ、リステリアなど）は、この機能を利用し細胞内に侵入し感染の進行を図っており（Cossart and Sansonetti, Science, 2004）、エンドサイトーシスと細菌感染の進行とは密接な関係にある。

一方、感染に対する宿主側防御を果たすメンブレントラフィック経路がオートファジーである。オートファジーの本来の機能は、飢餓状態への対応である。細胞が飢餓状態に陥ると細胞は栄養を確保するために自身の細胞質成分をオートファゴソームと呼ばれる膜で囲い込む。その後、オートファゴソームは細胞内消化器官であるライソソームと融合し、細胞質成分は分解され栄養源として使われる。

Group A Streptococcus (GAS ; A 群レンサ球菌) は咽頭・扁桃炎などの軽度の疾患から壊死性筋膜炎などの重篤な感染症の原因菌である。我々の研究室では、細胞質内へと侵入した GAS をオートファゴソームが捕獲し、その後オートファゴソームとライソソームとの融合により分解、殺菌することを見出した (Nakagawa *et al.*, Science, 2004)。

上記のように、オートファジーは殺菌機構に関与するはずなのだが、興味深いことに、歯周病原菌 *P.gingivalis* (*P.g.*) はオートファジーを中心とした細胞防御機構を回避することで非食細胞内に棲息し歯周病の慢性化を図っている可能性があることを我々の研究室では見出しつつある。このように、対バクテリアとして機能するはずのオートファジーは、細菌種によってその応答反応が異なる一面を持つ。しかしながら、オートファジーの異なる応答機構については殆んど明らかになってはいない。

また、急性炎症起炎菌である GAS は細胞に顕著な細胞傷害性を与えるため、細胞応答の検証は比較的容易である。一方、慢性感染症の原因菌は細胞に対し顕著な傷害を發揮することなく長期的な感染の進行を図るため、感染に対する細胞応答も微弱なものとなり慢性感染症の細胞病因論の理解と研究の進展は不十分となっている。*P.g.*も例外ではなく、歯周病の感染機序、及び慢性化については未解明の部分が数多く残っている。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病の原因菌を対象とし、細菌の宿主細胞への侵入と、それに対応する細胞側防御機構に焦点を当て、歯周病の慢性化に至る経路を明らかにすることを目的とする。

さらに、歯周病菌とは異なった細胞応答を誘導する劇症型起炎菌 A 群レンサ球菌 (GAS) も研究対象に含め、GAS が細胞に侵入し、細胞内消化器官で分解されるまでの経路のうち、特にオートファジーによる GAS の殺菌機構について詳細な検討を加え、歯周病に対する細胞応答との相違を際立たせる。

つまり、GAS 感染によって引き起こされた細胞応答を手がかりに、*P.g.* が引き起こす慢性感染症の細胞応答機構を明らかにすることで、人類史上最も患者数の多い歯周病の予防・治療に貢献し、国民医療費の抑制の一助となることを目的とする。

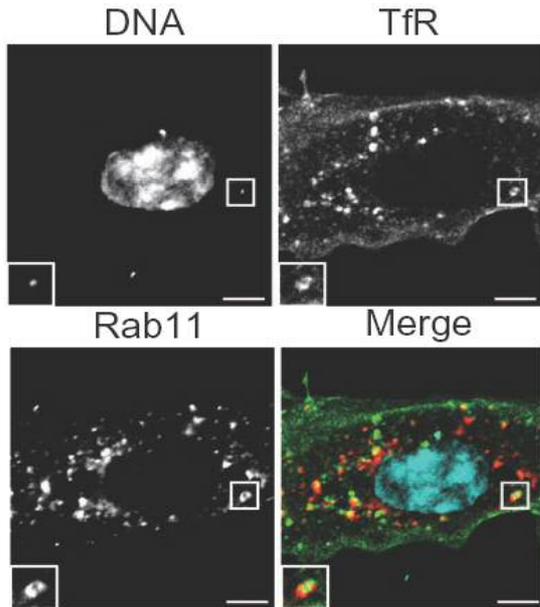
3. 研究の方法

GAS 感染によって引き起こされた細胞応答を手がかりに、*P.g.* が慢性疾患を引き起こすメカニズム、特に *P.g.* が細胞内で生存するために利用している細胞因子を明らかにすることを目的とする。具体的には GAS 感染によって形成される GcAV と高頻度に共局在するタンパク質をスクリーニングによって選抜する。その後、GcAV とライソソームとの融合に焦点を絞り、これら融合に関与するタンパク質を siRNA を用いたノックダウンシステムを利用して同定する。続いて同定したタンパク質が *P.g.* 感染によりどのような挙動を示すのか、またリン酸化やユビキチン化といった修飾の有無について検討する。また、同定されたタンパク質のノックダウンや過剰発現させた歯肉上皮細胞を構築し、*P.g.* の生存に影響を及ぼすか否かについて検討する。

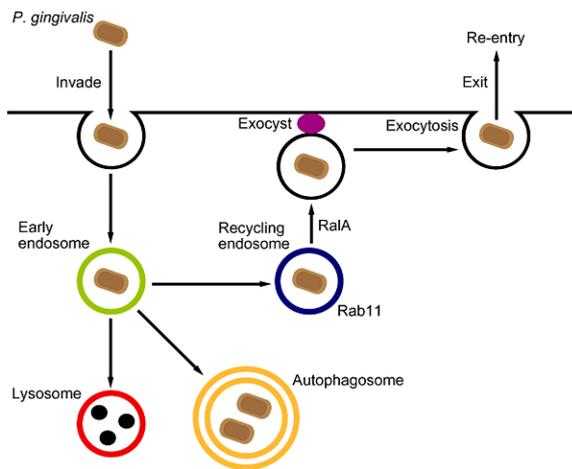
4. 研究成果

1) *P.g.* の細胞外への脱出について

*P.g.*が細胞内殺菌機構から逃れるために細胞外脱出と細胞への再侵入を繰り返し、結果として歯周病の慢性化を引き起こす可能性を示した。*P.g.*の細胞外脱出はリサイクリング経路と呼ばれる、エンドソームからリサイクリングエンドソームを経由した細胞内輸送経路を利用していること、さらに Rab11、RalA、エクソシストコンプレックスのノックダウンにより *P.g.*の細胞外脱出が阻害されたことから、これら因子が *P.g.*の細胞外脱出には必須であることを示した。



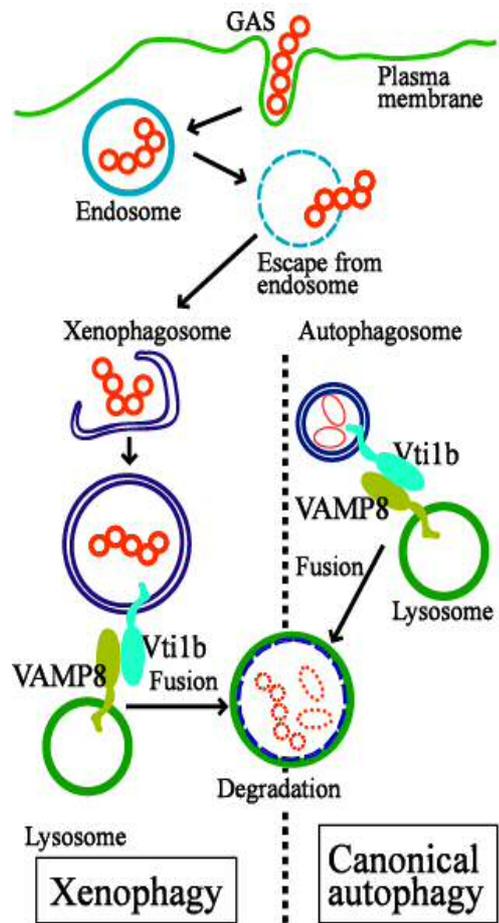
P.g. (DNA) と共局在を示すリサイクリングエンドソームマーカー (TfR, Rab11)。



*P.g.*の細胞内脱出経路のモデル図

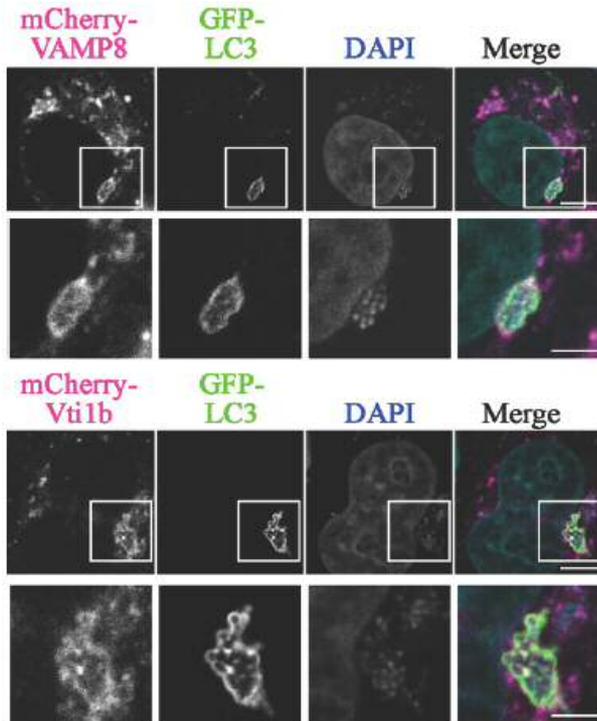
このように、歯周病原菌の筆頭である、*P.g.*が細胞外脱出と再侵入を繰り返し、疾病の慢性化を引き起こすことから、他の慢性化症状を引き起こす病原性細菌においても同様の現象が起きている可能性が示唆される。また、*P.g.*がオートファジーを利用して細胞内での生存を図っている現象にも着目し、現在、*P.g.*の細胞内生存に必須因子の探索を開始しており、候補タンパク質の同定を進めている。

2) オートファジーによるGASの殺菌機構について



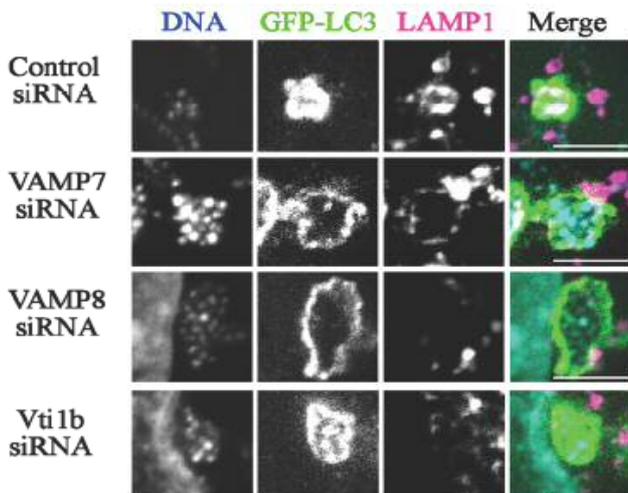
VAMP8、Vti1b とオートファジーの関係を示したモデル図。

細胞質内へと侵入したGASはオートファゴソームにより捕獲され、その後オートファゴソームとライソソームとの融合により分解、殺菌される。我々はGASを内包したオートファゴソームであるGcAV (GAS containing Autophagosome like Vacuole)とライソソームとの融合に必要なタンパク質として、細胞内小胞輸送に関与するとされているSNAREタンパク質群のうちVAMP8とVti1bを同定した。



GcAV マーカー (GFP-LC3) と共局在を示す VAMP8、及び Vti1。

さらに我々は、これらのSNAREタンパク質は対細菌機構としてのオートファジーだけではなく、飢餓で誘導されるオートファゴソームとライソソームとの融合にも関与していることを示した。



VAMP8、Vti1b のノックダウンにより GcAV マーカー(GFP-LC3)とライソソームマーカー (LAMP1) との共局在が阻害される。一方、コントロール、及び VAMP7 のノックダウンでは阻害は観察されない。

これにより、対バクテリアとしてのオートファジーと飢餓対応時のオートファジーには多数の共通因子が機能していることが示唆された。今後は *P.g.*感染時における、これら因子の動態を観察することで、慢性疾患である歯周病とオートファジーとの関連性が明らかになる事が期待される。

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 3 件)

1) Takeuchi H⁺, Furuta N⁺, Morisaki I, and Amano A. Exit of intracellular

Porphyromonas gingivalis from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. *Cellular Microbiology*

13: 677-91, 2011. (+These authors contributed equally)

2) Furuta N, Yoshimori T and Amano A.

Mediatory molecules that fuse autophagosomes and lysosomes.

Autophagy, 6, 417-418, 2010.

3) Amano A, Takeuchi H, and Furuta N.

Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. *Microbes and Infection*, 12, 791-798, 2010.

[学会発表] (計 1 件)

① 第 53 回歯科基礎医学会学術大会

2011 年 9 月 30 日

オートファジーの細胞内細菌排除機構における SNARE complex の役割 (歯科基礎医学会 賞受賞講演) 古田 信道

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 信道 (NOBUMICHI FURUTA)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：50452446