

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23792158

研究課題名（和文）「オートファジー受容体」の口腔上皮細胞の感染防御機構における役割の解明

研究課題名（英文）The elucidation of the role of 'autophagy receptor' in immune mechanism of oral epithelium cells

研究代表者

猪俣 恵（INOMATA MEGUMI）

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：40553798

研究成果の概要（和文）：近年、オートファジーが腸管上皮細胞の感染防御機構を制御していることが分かってきた。申請者は、オートファジーが口腔上皮細胞の感染防御機構、特に Toll 様受容体（TLR）による免疫応答においても重要な役割を果たしているのかを調べた。上皮細胞においてオートファジーはオートファジー受容体である NDP52 依存的に TLR 下流の分子を分解し、免疫応答を抑制した。ゆえに、オートファジー受容体が上皮細胞の感染防御機構を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Recent findings have shown that autophagy regulates immune mechanism in intestinal epithelial cells. The aim of this study is to investigate whether autophagy is involved in regulation of TLR-dependent immune responses in oral epithelium cells. This study reveals that the autophagy receptor NDP52 degrades TLR signaling molecules and downregulates TLR-mediated signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：口腔細菌学、歯周病学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：感染防御機構、オートファジー、Toll 様受容体（TLR）、ヒト上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

オートファジーはライソソームに依存して起こる細胞内分解システムであり、細胞質を広範囲に分解することで飢餓時における自己の栄養を確保するとともに、ミスフォールディングタンパク質などの変異タンパク質やダメージを受けた細胞内小器官を分解する細胞生存機構である。近年では、オートファジーは細胞内に侵入した微生物などを直接的に分解できるため、高頻度の細菌暴露を受ける腸管上皮細胞の感染防御機構を制御していることが分かってきた。さらに最近、オートファジーによる侵入細菌の分解機構には「オートファジー受容体」と呼ばれる分

子群によるユビキチン化を受けた細菌の認識が必須であることが報告されてきたが、その詳細については未だ明らかにされていない。

口腔上皮細胞も腸管上皮細胞と同様に高頻度の細菌暴露を受ける。口腔上皮細胞は口腔の感染防御機構の第一線に位置しており、単なる物理的バリアーとして機能するだけでなく、多様な役割を担っている。恒常的にディフェンシンや CAP18/LL37 などの抗菌性因子を産生するのみならず、感染微生物を Toll 様受容体（TLR）等を介して認識した場合には、ケモカインやサイトカインを速やかに産生する。TLR は病原体関連分子パターン

(TLR リガンド) の認識後、2 つのアダプター分子 MyD88 および TRIF を介して細胞内シグナル伝達を開始させ、自然免疫応答の活性化と獲得免疫応答の調節を行うことが知られている。MyD88 は TLR3 以外の全ての TLR アダプター分子として機能する。一方、TRIF は TLR3 ならびに TLR4 のアダプター分子として機能する。このような TLR を介した免疫応答をはじめとする口腔上皮細胞の感染防御機構は、強度に炎症を誘導することなく、効果的に感染の成立を防ぎ、口腔内の恒常性維持に大きく貢献していると考えられる。

申請者は、これらの背景から腸管上皮細胞と同様に高頻度の細菌暴露を受ける口腔上皮細胞の感染防御機構においてもオートファジーが何らかの重要な役割を果たしているかと推測した。

2. 研究の目的

本研究では、上記の推測のもと、口腔上皮細胞の感染防御機構、中でも TLR を介した免疫応答におけるオートファジー、特に「オートファジー受容体」の影響を調べ、その分子メカニズムを詳細に解析することを目的とした。

本研究の遂行にあたり、まず、ヒト上皮細胞株として広く研究に使われている HeLa 細胞を用いることとし、始めに HeLa 細胞の TLR リガンドに対する応答性について調べた。

3. 研究の方法

(1) 上皮細胞の TLR 刺激に対する応答の解析

上皮細胞の TLR リガンドに対する応答は、HeLa 細胞に TLR リガンドを作用させた後、定量的 RT-PCR やウェスタンブロットによって解析した。脱ユビキチン化酵素 A20 やオートファジー受容体の発現は RNA interference (RNAi) によって干渉した。

(2) TRIF へのオートファジー受容体の結合の解析

TRIF とオートファジー受容体との結合は、免疫沈降法により検討した。ヒト胎児腎細胞である 293T 細胞に FLAG タグを付与した TRIF 遺伝子を導入した。細胞溶解液から抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い SDS-PAGE で展開後、オートファジー受容体に特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(3) TLR 刺激によるオートファゴソームの形成の解析

オートファゴソームの形成の有無は、TLR 刺激を加えた細胞を固定・包埋後、電子顕微鏡観察によって調べた。

(4) 細胞内での TLR シグナル分子とオートファジー受容体の局在の解析

細胞内での TLR シグナル分子とオートファジー受容体の局在の解析は、上皮細胞に FLAG タグを付与した TRIF 遺伝子と HA タグを付与

した TLR シグナル分子を導入し、一定時間経過後細胞を固定し、蛍光免疫染色を行うことで解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト上皮細胞において TLR 刺激は細胞応答を活性化する

まず、ヒト上皮細胞の TLR リガンドへの応答性について調べた。ヒト上皮細胞株である HeLa 細胞に TLR3 のリガンドである合成二本鎖 RNA、poly(I:C) を作用させ炎症性サイトカインである IL-6 や IL-8、TLR 刺激によって発現が上昇し TLR シグナルを抑制することが知られている A20 の mRNA の発現を解析した。

その結果、poly(I:C) の刺激によって A20 の発現が増加しているのを確認した (図 1)。A20 の役割を検討するため、A20 の発現を RNAi によって抑制し poly(I:C) を作用させたところ、コントロールと比べて明らかに IL-6 と IL-8 の発現が増加しているのを確認した (図 1)。この結果からこれまでの報告通り、上皮細胞においても TLR リガンドは細胞応答を活性化するが、その応答は A20 によって抑制されていることが明らかになった。

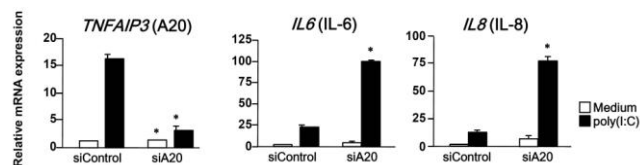


図 1

(2) A20 の発現抑制下において TLR 刺激は TRIF と TRAF6 を分解する

次に、A20 の発現抑制下において TLR 下流のシグナル伝達分子の発現に変化が見られるかどうかを調べた。

コントロールの細胞では poly(I:C) によって TRIF や TRAF6 などのシグナル伝達分子の発現に変化を認めなかった (図 2)。一方で意外なことに、A20 の発現を抑制した細胞では、poly(I:C) によって TRIF や TRAF6 が分解されていた (図 2)。この際、TRAF3 と GAPDH は分解されていなかった。そのため、A20 の発現抑制下では TLR 刺激は TRIF と TRAF6 を特異的に分解することが分かった。

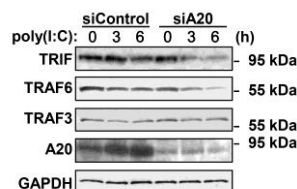


図 2

(3) A20 の発現抑制下において TLR 刺激はオートファジーを介して TRIF と TRAF6 を分解する

TLR 刺激がどのようなメカニズムを介して TRIF と TRAF6 を分解するのかを調べた。A20 の発現を抑制した細胞に poly(I:C) を作用させると、先程の結果通り、TRIF と TRAF6 のみが分解された (図 3A, B)。この分解は、広スペクトルのカスパーズ阻害剤である Z-VAD-fmk の影響を受けておらず、またプロテアソーム阻害剤である MG-132 の影響も受けてなかった (図 3A)。一方で、オートファジー阻害剤である 3-MA の存在下では、TRIF と TRAF6 の分解が明らかに抑制された (図 3B)。

これらの結果から、A20 に抑制されている TLR 刺激による TRIF と TRAF6 の分解はオートファジーに依存していることが考えられた。

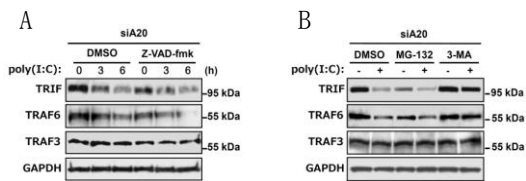


図 3

(4) A20 の発現抑制下において TLR 刺激はオートファジーを誘導する

現在までに、オートファジーが TLR 下流のシグナル伝達分子を分解することは明らかにされていなかったため、そのメカニズムを詳細に調べた。この実験系ではヒト単核細胞から分化させたマクロファージも使用した。HeLa 細胞およびマクロファージに poly(I:C) を作用させ、その変化を電子顕微鏡で観察した。コントロールの細胞では poly(I:C) によるオートファゴソーム様の構造物の形成はほとんど認められなかったが (図 4A、結果未記載)、一方で A20 の発現を抑制した細胞では、poly(I:C) による著明なオートファゴソーム様の構造物の形成が認められた (図 4B、結果未記載)。グラフは細胞質あたりのオートファゴソームの面積を数値化したものである。この結果から、TLR シグナルはオートファゴソームの形成を誘導するポテンシャルが有るが、通常は A20 によって抑制されていることが考えられた。

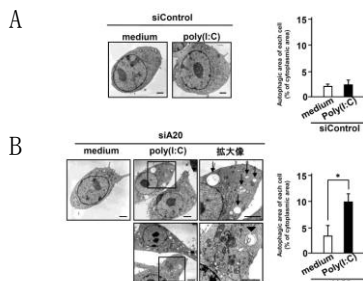


図 4

(5) TRIF と TRAF6 の分解はライソソームに依存している

種々のライソソームの機能を抑制する阻害剤の存在下での poly(I:C) による TRIF と TRAF6 の発現を調べた。

コントロールの細胞では TRIF と TRAF6 のみの分解が認められた。しかし種々のライソソーム阻害剤の存在下では、この分解は明らかに抑制されていた (図 5)。

この結果から TRIF と TRAF6 の分解はライソソームで起きていることが考えられた。前述のデータから TLR シグナルはオートファゴソームの形成を誘導することもわかったため、TRIF と TRAF6 はオートファゴソームで分解されることが考えられた。

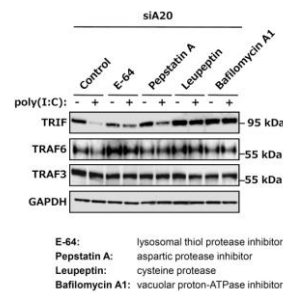


図 5

これまでの結果から、TLR シグナルに伴って TRIF と TRAF6 が特異的にオートファジー依存的に分解されることが考えられた。さらにこの分解は、A20 によって抑制されていることが考えられた。現在までに、オートファジーがシグナル伝達分子を特異的に分解することは報告されていなかったため、オートファジーによるシグナル分子の特異的な分解にはどのようなメカニズムが働いているのかを、特に「オートファジー受容体」の役割に着目して調べた。

(6) TRIF にはオートファジー受容体である NDP52 が結合する

現在までにオートファジー受容体として、SQSTM1, NBR1, HDAC6, NIX, BAG3, NDP52 の存在が明らかにされている。そこで今までに同定されている 6 種類のオートファジー受容体の TRIF への結合を調べたところ、興味深い事に NDP52 のみが TRIF と結合するオートファジー受容体として検出された (図 6)。

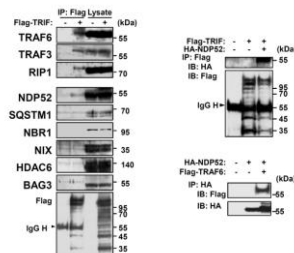


図 6

(7) NDP52 は TRIF と TRAF6 を選択的に分解する

実際にオートファジー受容体である NDP52 が poly(I:C) による TRIF の分解に関与しているかどうかを調べた。グラフはプロットをデンシトメトリーで数値化したものである。

A20 のみの発現を抑制した細胞では、poly(I:C) による TRIF の分解が見られた。しかし、NDP52 の発現を同時に抑制した細胞では、poly(I:C) による TRIF の分解が明らかに抑制された (図 7A)。この結果から実際に NDP52 が poly(I:C) による TRIF の分解に関与していることが考えられた。

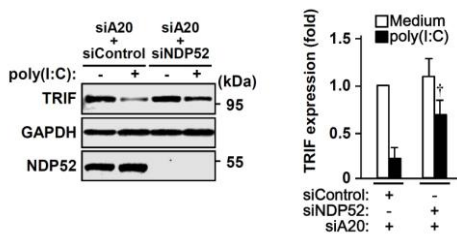


図 7A

293T 細胞に NDP52 と TRAF6 を同時に発現させウェスタンブロット法によって TRAF6 の発現を調べた。NDP52 は TRAF6 を分解した。またこの分解は、オートファジー阻害剤である 3-MA によって抑制された (図 7B)。同様の実験を TRAF3 でも行ったところ、NDP52 は TRAF3 を分解していなかった (図 7B)。

以上の結果から、NDP52 は TRIF と TRAF6 をオートファジーを介して選択的に分解するオートファジー受容体であることが明らかになった。

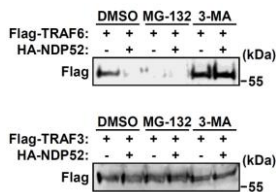


図 7B

(8) NDP52 の活性には C 末端領域が必要である

ヒト NDP52 は 446 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端に SKICH ドメイン、C 末端にリムライク (以下 LIM-L) ドメイン、その中間にコイルドコイル領域を有する (図 8A)。現在までに、C 末端の LIM-L ドメインが細菌のユビキチン鎖の認識に必須であることが報告されている。そこで NDP52 のどのドメインが TRIF への結合や分解に関与しているのかを、293T 細胞に TRIF と NDP52 あるいは NDP52 の truncate mutant を同時に発現させ、免疫沈降法ならびにウェスタンブロット法

で調べた。

SKICH ドメインを欠損した NDP52 は TRIF に結合せず、LIM-L ドメインを欠損した NDP52 は TRIF に結合したため、結合には SKICH ドメインが必要であることが考えられた (図 8B)。一方 LIM-L ドメインを欠損した NDP52 は、TRIF を分解しなかった。これらの結果から、NDP52 は SKICH ドメインを介して TRIF に結合した後、LIM-L ドメインを介して TRIF のユビキチン鎖を認識し TRIF を分解することが考えられた (図 8C)。

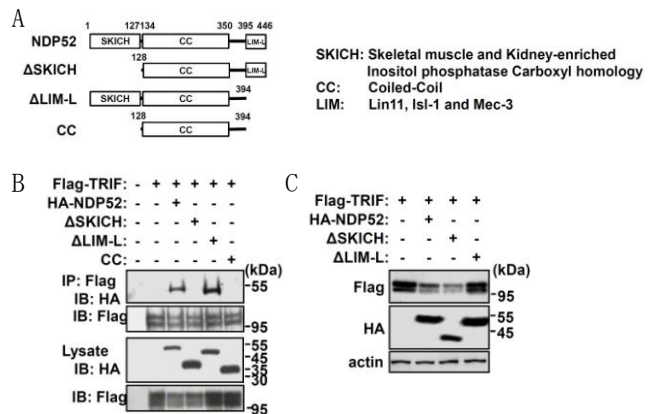


図 8

(9) NDP52 は TRAF6 を凝集させる

オートファジー受容体は標的に付加されたユビキチン鎖を認識し、それらを凝集させることでオートファジーを介して特異的に分解することが分かっている。

細胞内における TLR シグナル伝達分子とオートファジー受容体との局在を TRAF6 のみ、あるいは TRAF6 と NDP52 を細胞内に発現させた状態において、NDP52 と TRAF6 の発現を免疫染色法によって調べた。

TRAF6 のみを細胞内に発現させた場合は、TRAF6 は細胞質に均一に染まって見えた (図 9A)。しかし、NDP52 の存在下では凝集し、さらに NDP52 と共局在を示した (図 9A)。グラフは TRAF6 の凝集をカウントし凝集程度を示したものである。この結果から NDP52 は TRAF6 を凝集させていることが考えられた。

下の図は TRAF6 のみ、あるいは TRAF6 と NDP52 を細胞内に発現させて TRAF6 とポリユビキチン化されたタンパク質の発現を調べたものである。グラフはポリユビキチン鎖の凝集をカウントし凝集程度を示している。

TRAF6 のみを細胞内に発現させた場合は、TRAF6 は凝集していなくてもポリユビキチン化されたタンパク質が凝集していた (図 9A)。NDP52 の存在下では TRAF6 はポリユビキチン化されたタンパク質と共局在を示した (図 9A)。この結果から NDP52 はポリユビキチン化された TRAF6 を凝集させていることが考えられた。

A20 の発現抑制下において NDP52 による TRAF6 の凝集効果がどうなるかを調べた。A20 の発現を抑制した状態では NDP52 と TRAF6 の凝集塊が増加した (図 9B)。さらに、その凝集塊はユビキチン鎖と共局在を示した。

この結果から A20 が NDP52 の TRAF6 凝集効果を抑制していることが考えられた。TRAF6 を TRIF に置き換えた実験でも同じような傾向が見られた。

これらの結果から、NDP52 は TRAF6 と TRIF のポリユビキチン鎖を認識しそれらを凝集させることで特異的に分解に導くことが考えられた。

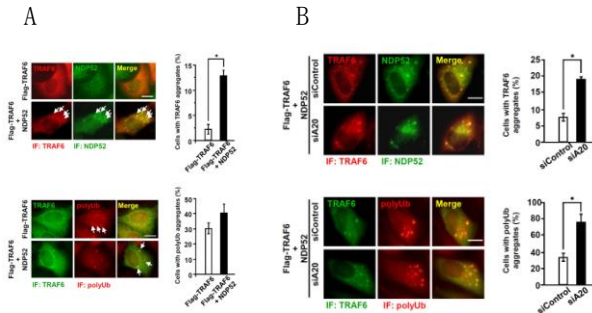


図 9

(10) NDP52 は TRAF6 によってユビキチン化される

TRAF6 は E3 ユビキチンリガーゼであり、標的タンパク質をユビキチン化することで活性化することが知られている。

左の図は 293T 細胞に TRAF6 あるいは TRAF3 と NDP52 を同時に発現させ、免疫沈降した NDP52 のポリユビキチン化をウェスタンブロット法で調べたものである。

免疫沈降した NDP52 は明らかに TRAF6 によってポリユビキチン化されていた (図 10A)。一方で TRAF3 は、TRAF6 に比べて非常に弱い程度で NDP52 のポリユビキチン化を誘導していた (図 10A)。さらに A20 の発現抑制下では、TRAF6 による NDP52 のポリユビキチン化が増加した (図 10B)。

これらの結果から NDP52 は TRAF6 によってユビキチン化されることで活性化されることが考えられた。またその活性化は A20 によって抑制されていることが考えられた。

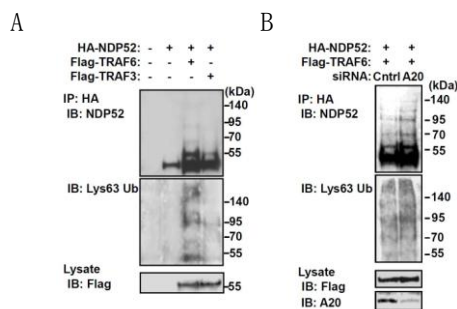


図 10

これまでの結果から、TLR シグナルが入ると、TRIF と TRAF6 が活性化され、NDP52 が TRAF6 依存的にユビキチン化されることで TRIF と TRAF6 を凝集させこれら分子を特異的にオートファジーによって分解することが考えられた。このような NDP52 の作用は A20 によって抑制されていることも考えられた。

そこで、A20 が存在しない場合には、NDP52 による TRIF と TRAF6 の分解が誘導されることから、A20 が存在しない場合には、NDP52 が TLR シグナルを抑制するのではないかと仮説を立て次の実験を行った。

(11) A20 は NDP52 による TLR シグナル抑制作用を制御している

NDP52 のみ、あるいは、NDP52 と A20 の発現を同時に抑制した状態で、poly(I:C) を作用させ、IL-6、IL-8 および CXCL-10 の mRNA の発現を解析した。

NDP52 のみの発現を抑制しても、IL-6、IL-8 ならびに CXCL-10 の mRNA の発現に変化をほとんど認めなかった。一方で、興味深い事に NDP52 と A20 を同時に抑制したところ、これらの発現が著明に増加した (図 11)。

よって NDP52 の TLR 抑制作用は A20 が存在すると発揮されていないことが考えられた。

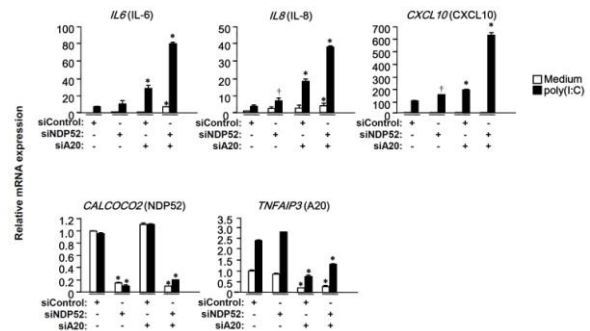


図 11

以上の (1) ~ (11) 結果から、本研究の結果を図 12 にまとめた。通常 A20 が存在する場合には、TRAF6 などのユビキチン化が A20 によって脱ユビキチン化されることで、シグナルが抑制されていることが分かっている。さらに本研究の結果によって、A20 はオートファジーも抑制し、さらにはオートファジー受容体である NDP52 のユビキチン化による活性化も抑制していることが考えられた (図 12A)。

一方、A20 が存在しないと仮定した場合には、TRAF6 が NDP52 をユビキチン化することで活性化することが考えられた。活性化された NDP52 は TRIF、TRAF6 を凝集させ、オートファジー依存的にこれら分子を分解することでシグナルを抑制していることが考えられた (図 12B)。

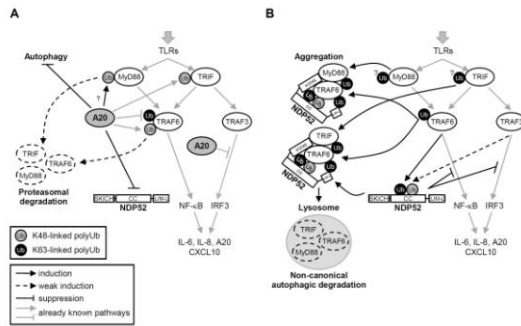


図 12

本研究は今まで明らかにされていなかったオートファジーならびにオートファジー受容体による TLR シグナルの調節機構を発見した。発見した調節機構の生物学的意義は明確でないため、今後生体内で検討していく必要があり、特に口腔の感染防御機構あるいはその破綻のメカニズムにどのような役割を果たしているのかを調べることは課題の一つであると考えている。このような検討を通して歯周病などの口腔感染症の病態形成の解明の道筋が開けるかもしれないと考えている。

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. Inomata Megumi, and Into Takeshi. Nuclear dot protein 52, an autophagy-associated protein, regulates Toll-like receptor signaling. J. Oral Biosciences 54(3), 151-154 (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2012.04.004>, 査読有り

2. Inomata Megumi, Niida Shumpei, Shibata Ken-ichiro, and Into Takeshi. Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20. Cell Mol. Life Sci. 69(6), 963-979 (2012), doi: 10.1007/s00018-011-0819-y. 査読有り

3. Into Takeshi, Inomata Megumi, Takayama Eiji, and Takigawa Toshiya. Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. Cell Signal. 24(6), 1150-1162 (2012), doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.020. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

1. Inomata Megumi and Into Takeshi. Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective

autophagy. 6th International Symposium on Autophagy 2012, Okinawa, JAPAN, Oct. 28 - Nov 1, 2012

2. Inomata Megumi, Shibata Ken-ichiro, and Into Takeshi.

Regulation of Toll-like receptor signaling by human NDP52-mediated selective autophagy. The annual meeting of Japanese Society for Immunology, Chiba, JAPAN, Nov. 27, 2012

3. 猪俣 恵、引頭 毅 オートファジーによる Toll 様受容体を介した細胞内シグナル伝達の調節 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 岐阜 2011 年 9 月 30 日

4. 猪俣 恵、新飯田 俊平、柴田 健一郎、引頭 毅 NDP52 は選択的オートファジーの誘導によって Toll 様受容体シグナルを負に制御する 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 岐阜 2011 年 10 月 2 日

[その他]

ホームページ等

朝日大学歯学部口腔感染医療学講座口腔微生物学分野ホームページ
<http://scw.asahi-u.ac.jp/~bac/index.htm>
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪俣 恵 (INOMATA MEGUMI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：40553798

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：