

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 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24659196

研究課題名（和文） リステリアのエフラックスポンプによる病原性発現機構

研究課題名（英文） Critical role of multidrug efflux pump in the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*

研究代表者

光山 正雄 (MITSUYAMA MASAO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10117260

研究成果の概要（和文）：

各種リステリア株のうち、L028 株は感染マクロファージから interferon- β (IFN- β) 産生を誘導する能力が著しく強い。この L028 株では薬剤排出ポンプの一つである MdrT が高発現しており、それは MdrT の発現抑制に関わる tetR 遺伝子の部分欠損による機能不全が原因であることが示されている。L028 株はマクロファージに感染後、この MdrT を介して cyclic di-AMP を大量に分泌し、その結果 STING に依存したシグナル経路が活性化され IFN- β 産生が著しく亢進することが示された。また、L028 株と mdrT 欠損株をマウスに感染させたところ、mdrT 欠損株の臓器内菌数は L028 株よりも有意に高い値を示した。一方、I 型 IFN レセプター欠損マウスはリステリア感染に対して抵抗性を示したことから、cyclic di-AMP が IFN- β 産生以外に宿主防御反応の亢進にも関与するのか、あるいは MdrT は cyclic di-AMP 以外にも宿主感染防御を刺激する因子の放出に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Among various strains of *Listeria monocytogenes*, L028 strain is highly capable of inducing IFN- β production in infected macrophages. In this study, at first the molecular mechanism of the IFN- β -inducing ability of L028 was investigated. It was found that L028 secretes a large amount of cyclic-di AMP that probably triggers IFN- β production through activation of STING-dependent signal pathway. The secretion of cyclic di-AMP was dependent on MdrT, a multidrug resistant transporter, and L028 exhibited a very high level of *mdrT* expression due to functional impairment of TetR, a negative regulator of *mdrT*. Furthermore, an infection experiment revealed that the strong expression of *mdrT* decreases the pathogenicity of *L. monocytogenes* whereas type I IFN receptor knockout mice were resistant to *L. monocytogenes* infection compared to wild type mice. Result suggested that cyclic di-AMP may promote resistance independently of IFN- β production or MdrT may contribute to secrete some other factors that are implicated in the control of *L. monocytogenes* replication *in vivo*.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

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：細菌、リステリア、マクロファージ、インターフェロン

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

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染防御に重要な役割を果たす I 型インターフェロン (IFN) は、種々の細菌感染でも産生誘導される。細胞内寄生菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*) も、感染マクロファージから炎症性サイトカインおよび I 型 IFN 産生を誘導するが、感染後の自然免疫応答における意義については未だに不明である。また、リステリア感染では菌の細胞質内侵入が I 型 IFN 産生に必須であることがわかっているが、その機序については不明な点が多く残されている。さらに、リステリア感染防御に対する I 型 IFN の影響については相反する結果が報告されており、必ずしもコンセンサスが得られていない。

2. 研究の目的

これまで、リステリアの細胞内寄生を可能にする病原因子と宿主サイトカイン産生応答の関係を解析し、リステリオリシン 0 (LLO) が菌のファゴソームからの脱出を可能にすると同時に、各種炎症性サイトカイン産生を誘導する機序を明らかにしてきた。また、LLO が calpain や caspase-1 の活性化に必須であることや、AIM2 を介した新たな inflammasome 形成に関与することを示している。リステリア感染ではマクロファージからの IFN- γ 産生も誘導される。他の炎症性サイトカイン産生と比較するとそのレベルは必ずしも高くはなく、また菌の細胞質内侵入が必要であることから、IFN- γ 産生誘導には、細胞質内に存在する病原体センサーを介したシグナル経路の活性化が必要になる。これまでの報告から、IFN- γ はリステリアの感染病態に深く関与することが考えられており、その誘導機序や、感染防御における役割を明確にすることは、宿主感染防御応答の全体像を明らかに上で重要な要素となる。

各種リステリア菌株の比較から、L028 株は他の菌株と同レベルの LLO 産生能を示すが、その IFN- γ 産生誘導活性は極めて高く、またその活性には菌の薬剤排出ポンプが関与することがこれまでのトランスポゾン挿入変異株を用いた解析から明らかにされている。そこで本研究では、リステリアの薬剤排出ポンプを介して放出されるリステリア因子がどのような機序で IFN- γ 産生誘導を引き起こすのか、また多数存在する薬剤排出ポンプの何れもが同様に IFN- γ 産生誘導に関わるのか、さらに IFN- γ 産生誘導能が菌の病原性のどの程度関わるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに報告された感染実験の成績と同様に、リステリア L028 株由来の IFN- γ 誘導にも cyclic di-nucleotide が関与するかどうかを明らかにするため、L028 および EGD 株の培養上清を回収し、TOF-MS で解析する。また、cyclic di-nucleotide 分解酵素で処理した場合の IFN- γ 誘導活性を解析し、L028 株由来の IFN- γ 誘導因子を同定する。

リステリアのゲノム情報から、想定される薬剤排出ポンプ遺伝子が判明しているため、それらの遺伝子の発現量を L028 と EGD 株と比較する。また、それら薬剤排出ポンプ遺伝子欠損株を作製し、マクロファージに感染させた場合の IFN- γ 産生誘導能を調べる。さらに、薬剤排出ポンプ遺伝子欠損株のうち、IFN- γ 産生誘導能に著明な変化をきたす株と L028 株をマウスに感染させ、臓器内菌数の変動を調べる。

4. 研究成果

リステリア菌株間のサイトカイン産生誘導能の比較から、リステリアの標準的な病原菌株として用いられる EGD 株に比べて L028 株は強い IFN- γ 産生誘導能を示すことが明らかとなった。L028 株と EGD 株の感染マクロファージ内の動態や、感染後の IL-6 および IL-18 産生レベルに違いがないことから、L028 株にみられる強い IFN- γ 産生誘導能は菌株間の細胞内増殖能の優劣や、細胞質内で病原体センサーを刺激する菌由来 DNA 量の違いによるものではないことが示された。また、L028 株の IFN- γ 産生誘導活性は培養上清中に認められ、質量分析の結果、大量の cyclic di-AMP が存在することが示された。さらに、L028 の IFN- γ 誘導活性はフォスホエステラーゼ処理により阻害されることから、L028 株の強い IFN- γ 産生誘導活性は cyclic di-AMP に依存することが明らかとなった。L028 と EGD 株の比較ゲノム解析の結果、L028 株では薬剤排出ポンプの一つである MdrT の発現を制御する tetR に遺伝的欠損があり、MdrT の発現が亢進していること。また、L028 株では cyclic di-AMP は主に MdrT を介して菌体外に放出されることが示された。これらの結果から、L028 株の強い IFN- γ 産生誘導能は、高発現している MdrT を介して多量の cyclic di-AMP が放出されるためであることが明らかとなった。さらに、cyclic di-AMP は STING が関与する異物識別経路を刺激して IFN- γ 産生を誘導することが示された。

リステリアの抵抗性に及ぼす MdrT の影響を調べるため、L028 株と mdrT 欠損株をマウ

スに感染させた。mdrT 欠損株の感染で誘導される IFN- γ 量は L028 株感染の場合に比較して明らかに低いレベルであった。しかし、mdrT 欠損株の臓器内菌数は L028 株よりも有意に高い値を示した。一方、I 型 IFN レセプター欠損マウスはリステリア感染に対して抵抗性を示したことから、cyclic di-AMP は IFN- γ 産生誘導以外の機序で感染防御を亢進させるのか、あるいは MdrT が cyclic di-AMP 以外にも宿主応答を刺激する因子の放出に関与する可能性が示された。

本研究により、リステリアの有害な薬剤排出ポンプの異常発現が cyclic di-AMP の大量分泌による IFN- γ 産生の亢進をきたすこと。また、薬剤排出ポンプより分泌されるリステリア因子が、宿主感染防御の増強に関与する可能性を示すことができた。これらの成果から、リステリアの薬剤排出ポンプが菌の薬剤耐性だけでなく、その病原性や宿主感染防御誘導にも関与するという新規概念を提唱できるものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Yokobori N, López B, Geffner L, Sabio Y, García C, Schierloh P, Barrera L, de la Barrera S, Sakai S, Kawamura I, Mitsuyama M, Ritacco V, Del Carmen Sasiain M. Two genetically-related multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models. *Infect Genet Evol.*、査読有、16: 151-156, 2013.
DOI: 10.1016/j.meegid.2013.01.007

(2) Hernandez-Cuellar E, Tsuchiya K, Hara H, Fang R, Sakai S, Kawamura I, Akira S, Mitsuyama M. Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J Immunol.*、査読有、189: 5113-5117, 2012.
DOI: 10.4049/jimmunol.1202479

(3) Yamamoto T, Hara H, Tsuchiya K, Sakai S, Fang R, Matsuura M, Nomura T, Sato F, Mitsuyama M, Kawamura I. *Listeria monocytogenes* strain-specific impairment of the TetR regulator underlies the drastic increase in cyclic di-AMP secretion and beta interferon-inducing ability. *Infect Immun.*、査読有、80: 2323-2332, 2012.
DOI: 10.1128/IAI.06162-11

[学会発表] (計 11 件)

- ① 河村伊久雄 PD-1 シグナル経路による抗結核防御免疫の制御. 第 82 回実験結核研究会、2012 年 5 月 9 日、広島市
- ② 河村伊久雄 結核菌による宿主感染防御の発現制御. 第 87 回日本結核病学会、2012 年 5 月 10 日、広島市
- ③ 原 英樹 リステリア感染における主要病原因子 listeriolysin O 依存的なインフラマソーム応答の役割. 第 23 回日本生体防御学会学術総会、2012 年 7 月 11 日、東京都
- ④ Hernandez-Cuellar, E. Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. 第 65 回日本細菌学会関西支部総会、2012 年 11 月 17 日、神戸市
- ⑤ Qu, H. Critical role of listeriolysin O in calpain activation, which is triggered after evasion of *Listeria monocytogenes* from the phagosome into the cytoplasm of infected macrophages. 第 65 回日本細菌学会関西支部総会、2012 年 11 月 17 日、神戸市
- ⑥ Hernandez-Cuellar, E. Nitric oxide-dependent suppression of the NLRP3 inflammasome activation. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸市
- ⑦ Hara, H. Involvement of the domain 3 of listeriolysin O in inflammasome activation induced by *Listeria monocytogenes* infection. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸市
- ⑧ Tsuchiya, K. The inflammasome adaptor ASC plays a host-detrimental role in lethal infection with *Listeria monocytogenes*. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5 日、神戸市
- ⑨ Hara, H. The Thr223 in listeriolysin O is essential for the ability to induce the inflammasome activation. 第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日～20 日、千葉市
- ⑩ Qu, H. The role of listeriolysin O in calpain activation in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages. 第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日～20 日、千葉市
- ⑪ Tsuchiya, K. Role for NLRP3 and ASC in *Streptococcus pneumoniae* infection. 第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日～20 日、千葉市

[図書] (計 1 件)

- (1) 酒井俊祐、光山正雄、近代出版、臨床と微生物、結核菌感染の病態、2012 年、

pp. 109-115

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光山 正雄 (MITSUYAMA MASAO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10117260

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし