

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293372

研究課題名(和文) オートファジーは歯周病菌が攪乱した細胞内秩序を再び律するのか？

研究課題名(英文) How autophagy regulate periodontal bacterium

研究代表者

野田 健司 (Noda, Takeshi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00290908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は歯周病菌とよばれるPorphyromonas gingivalisをはじめとした細菌群の定着感染に惹起される歯肉および歯槽骨での上皮、マクロファージ、破骨細胞などの可能な免疫反応がその病因である。この発症過程においてエンドサイトーシスおよびオートファジーがどのように関与するのかはほぼ不明であった。本研究により、Porphyromonas gingivalisの感染にLYSTを介したエンドサイトーシス、および破骨細胞で特異的に発現するタンパク質を介したミクロオートファジーが発見され、それらが歯周病発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is caused by excessive immunological reaction in epithelium, macrophage, and osteoclast in the gums and alveolar bone, which is caused by colonization of bacterium such as Porohyromonus gingibalis. In this study we revealed that Porohyromonus gingibalis invasion is associated with LYST mediated endocytosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー エンドサイトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病菌とよばれる *Porphyromonas gingivalis* をはじめとした細菌群の定着感染に惹起される歯肉をおよび歯槽骨での上皮細胞、マクロファージ、破骨細胞などでの過剰な免疫反応がその原因である。特に *P.gingivalis* は歯肉細胞内にエンドサイトーシスを介して侵入すること、およびその一部が細胞内の構造の特殊な膜構造により包み込み分解する現象オートファジーにより包まれることが近年観察されている。しかしその生理的重要性は未解明のままであった。またオートファジーの分子機構は徐々に明らかになりつつあるが、その詳細はまだ未知な部分が多い。

## 2. 研究の目的

上皮細胞、マクロファージ、破骨細胞などでオートファジーやエンドサイトーシスの活性を探る。また上皮細胞や、その他のモデル細胞を用いて、その制御機構を探求する。そのことによりエンドサイトーシスやオートファジーが歯周病の進展に影響する可能性について、解析する。さらにオートファジーの分子機構の解明を行うことで、それらをもとにした歯周病治療ターゲットの創出を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 歯肉上皮培養細胞に歯周病発症と強い相関があることが知られているチャディアックヒガシ症候群の原因遺伝子 *LYST* の発現抑制を行う。*Porphyromonas gingivalis* を感染させ、エンドサイトーシスおよびオートファジーがどの様に影響されたかを検定する。

(2) 歯周病発症時に過活動となることが知られている破骨細胞においてエンドサイトーシスの役割を調べるために、破骨細胞で特異的に発現されている低分子量 G タンパク質 Rab の同定を行う。マウス骨髄由来マクロファージを RANKL CMOS 刺激で破骨細胞へと分化させ、その前後の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法により解析する。また破骨細胞に GFP タグした Rab を全種類発現させ、特徴的なパターンを示す Rab を選抜する。選ばれた Rab のエンドサイトーシスおよびオートファジーにおける機能を解析する。

(3) 上記のオートファジーの解析をさらに詳細に行うため、オートファジー分子機構の解析を行う。オートファジーマーカーとしてのオートファジーに必須な膜タンパク *Atg9* の確立を行うため、その細胞内動態を解析する。またオートファジー誘導機構の解析のため、

*MTMR3* の結合分子を質量分析により同定し、その解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) 肉上皮培養細胞において *LYST* の発現を *SiRNA* を用いて行った。一般的なエンドサイトーシスに著名な遅滞とともに、リソソームの膨潤が観察された。*Porphyromonas gingivalis* を感染させたところ、エンドサイトーシス経路の途上で、蓄積が観察され、さらに GFP-LC3 をはじめとするオートファジーマーカーの蓄積が見られた。このことは *LYST* を介したエンドサイトーシス不全が歯肉上皮細胞での *Porphyromonas gingivalis* のリサイクリングに影響をあたえることにより、オートファジーを惹起していることが示唆された(発表準備中)。

(2) 破骨細胞で特異的に発現上昇する Rab の同定に成功した。この Rab はエンドサイトーシスの途上の経路にある新規オルガネラに局在することが判明した。さらにこれとホモロジーのある別の Rab はマクロファージで発現し、同様のオルガネラに局在した。すなわち歯周病菌の貪食や、破骨細胞による歯槽骨吸収に、これらの Rab が関与することが示唆された。さらにこれらの新規オルガネラの内部には、別のオルガネラが貪食され、最終的に分解されていることが見出された。このオルガネラの酸性化を阻害するとその分解が抑制された。これは新たなオートファジー様の現象であり、マクロファージや破骨細胞の活動に密接に関わる可能性が示唆され、歯周病治療戦略の新たなターゲットとなることが期待される。

(3) *Atg9* は膜タンパクであるが、ゴルジ体に主に局在する。GFP-*Atg9* の様々なトランケーション変異体を上皮細胞に発現させたところ、N末端のトランケーションによりゴルジ体からリサイクリングエンドソームへその局在が変化することが判明した。N末端をさらに詳細に解析したところコートタンパク質である AP-2 に結合する配列を発見した。その配列に変異を導入すると、やはりリサイクリングエンドソームに蓄積した。その変異をもつ *Atg9* はオートファジー能を示さないことが判明した。その変異をもつ *Atg9* は AP2 の結合が見られなかった。これらのことから *Atg9* は N末端領域を介して、AP2 に結合し、そのことでリサイクルエンドソームからゴルジ体へ戻り、そこからオートファジーの膜形成箇所へ動員される一連の流れがあることが解明された。さらにホスファチジルイノシトール 3 ホスファターゼ *MTMR3* がオートファジー制御に関わる分子基盤を解明する目的で、*MTMR3* の結合タンパク質を質量

分析法により探索したところ、mTORC1 が結合することが明らかとなった。さらに MTMR3 結合により、mTORC1 の活性が抑制され、そのことによりオートファジーが誘導されることが明らかとなった。これらのことより、オートファジーの制御がホスファチジルイノシトール3ホスフェート代謝と密接にカップルすることが明らかとなった。以上の分子機構は、オートファジー制御薬開発の格好の分子標的となることより、今後これらの研究を進展させることで、新たな歯周病治療法の開発に繋がる可能性がある。

#### 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 10 件)

1. 野田健司 オートファジーの機構の解明 -駒場で芽吹き蕾を育み、岡崎で花開き、世界で果実を共有する 科学、87. 1, 68-70, 2017
  2. 野田健司 大隅良典先生のオートファジー研究：辺境から生まれたノーベル賞学術の動向 2, 13-17 2017
  3. Ogasawara, Y., Kira, S., Mukai, Y., Noda, T., and Yamamoto, A. (2017) Ole1, fatty acid desaturase, is required for Atg9 delivery and isolation membrane expansion during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biology Open*. **6**, 35-40 DOI: 10.1242/bio.022053
  4. Araki, Y., Kira, S., and Noda, T. (2017) Quantitative Assay of Macroautophagy Using Pho8 60 Assay and GFP-Cleavage Assay in Yeast. *Meth. Enzymol.* **588**, 307-321 DOI: 10.1016/bs.mie.2016.10.027
  5. **荒木保弘、野田健司** オートファジー：長年の謎を解き明かした大隅良典博士と酵母 月刊化学, **71**, 12, 19-22, 2016
  6. Imai, K., Hao, F., Fujita, N., Tsuji, Y., Oe, Y., Araki, Y., Hamasaki, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2016) Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J Cell Sci.* **129**, 3781-3791 DOI: 10.1242/jcs.196196
7. Klionsky, D. J., Noda, T. 他 (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. **12**, 1-222 DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356
  8. 4. Hao, F., Itoh, T., Morita, E., ShirahamaNoda, K., Yoshimori, T., and Noda, T. (2016) The PtdIns3-phosphatase MTMR3 interacts with mTORC1 and suppresses its activity. *FEBS Lett.* **590**, 161-173 DOI: 10.1002/1873-3468.12048
  9. Kira, S., Kumano, Y., Ukai, H., Takeda, E., Matsuura, A., and Noda, T. (2015) Dynamic relocation of the TORC1-Gtr1/2-Ego1/2/3 complex is regulated by Gtr1 and Gtr2. *Mol Biol Cell.* **27**, 382-396 DOI: 10.1091/mbc.E15-07-0470
  10. Kira, S., Tabata, K., ShirahamaNoda, K., Nozoe, A., Yoshimori, T., and Noda, T. (2014) Reciprocal conversion of Gtr1 and Gtr2 nucleotide-binding states by Npr2-Npr3 inactivates TORC1 and induces autophagy. *Autophagy*. **10**, 1565-1578 DOI:10.4161/auto.29397
- [学会発表](計 15 件)
1. Noda T (Mar. 21, 2014) How will the autophagy study contribute to the oral biology? Joint Symposium of Osaka University Graduate School of Dentistry and Yonsei University College of Dentistry (Seoul, Korea)
  2. Noda T (Apr. 26, 2014). Regulation of autophagy by membrane traffic and TORC1, Cell Signaling & Membrane Traffic Symposium (San Diego, USA)
  3. Noda T (Dec.18-21, 2014) Molecular mechanism involved in autophagy termination 2014 Northeastern Asian Symposium on Autophagy (Busan, Korea)
  4. Noda T (Mar. 20, 2015) Genome-wide survey of the factors affecting autophagic activity, The 7th International Symposium on Autophagy "Regulation of Autophagy" (Anhui,

- China)
5. Kira S, Tabata K, Shirahama-Noda K, Nozoe A, Yoshimori T, Noda T (Mar. 16-21, 2014) Reciprocal conversion of Gtr1 and Gtr2 nucleotide-binding states by Npr2-Npr3 inactivates TORC1 and induces autophagy, Gordon Research Conference: Autophagy in Stress, Development & Disease (Barga, Italy)
  6. Noda T, Kira S, Shirahama-Noda K (Apr. 26-30, 2014) Npr2 regulates autophagy via Gtr1-Gtr2-dependent Target of Rapamycin Complex 1 signaling, American Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting, (San Diego, USA)
  7. Imai K, Fujita F, Tsuji Y, Noda T, Yoshimori T (Oct. 9-10, 2014) Golgi-endosome trafficking of Atg9L1 is required for autophagy, 2nd International Picobiology Institute Symposium (Hyogo, Japan)
  8. Hao F, Ito T, Morita E, Yoshimori T, Noda T (Mar. 19, 2015) MTMR3 interacts with mTORC1 and inhibits its activity, The 7th International Symposium on Autophagy "Regulation of Autophagy" (Anhui, China)
  9. Kumano Y, Kira S, Noda T (Mar. 19, 2015) Analysis of the new subunit of the EGO complex, The 7th International Symposium on Autophagy "Regulation of Autophagy" (Anhui, China)
  10. Noguchi M, Kira S, Noda T (Mar. 19, 2015) Study of termination mechanism of autophagy under prolonged starvation, The 7th International Symposium on Autophagy "Regulation of Autophagy" (Anhui, China)
  11. Noda T, **Autophagy Regulation by Gtr-Gia-Tag Network** The 4th Sino-Japan Symposium on Autophagy, Apr 23, 2016, Beijing
  12. Noda T. Study of termination mechanism of autophagy under prolonged starvation the 14th International Congress on Yeasts" Sep 11-15, 2016, Hyogo
  13. Ukai H, Araki Y, Kira S, Noda T: Novel

mode of TORC1-regulation, 14<sup>th</sup> International Congress on Yeasts, September 11-15, 2016, Hyogo

14. Ukai H, Araki Y, Kira S, Noda T: Pib2 is involved in a novel mode of TORC1-regulation, Cell biology 2016 ascb annual meeting, December 3-7, 2016, San Francisco
15. Kira S, Noguchi M, Noda T, Study of termination mechanism of autophagy under prolonged starvation. Cell biology 2016 ascb annual meeting, December 3-7, 2016, San Francisco

〔図書〕(計 1 件)

1. 野田健司 オートファジー メンブレン  
トラフィック 福田光則 吉森保編 化学同人 京都 48-63 . 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~cfos/index.html>

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

野田 健司 (Noda Takeshi )  
大阪大学大学院 歯学研究科 教授  
研究者番号 : 00290908

##### (2)研究分担者

天野 敦雄 (Amano Atsuo )  
大阪大学大学院 歯学研究科 教授  
研究者番号 : 50193024