

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：17201
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25460538
 研究課題名(和文)細胞内のレジオネラを認識する宿主因子複合体・インフラマソームの分子生物学的解析

 研究課題名(英文)Molecular analysis of the host inflammasome involved in the recognition of intracellular Legionella

 研究代表者
 宮本 比呂志(MIYAMOTO, HIROSHI)

 佐賀大学・医学部・教授

 研究者番号：40229894

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：レジオネラ感染に応答するのはC57BL/6由来のNaip5のみであることがわかった。Balb/cのNaip5は、C57BL/6のNaip5と同様にアポトーシスを抑制したが、パイロトーシスは誘導しなかった。A/JのNaip5は、アポトーシスにもパイロトーシスにもほとんど影響を与えなかったことから、機能自体が欠損していると考えられた。また、活性酸素種で誘導される細胞死は、C57BL/6-Naip5によって顕著に促進され、Balb/c-Naip5によって抑制された。これらの結果は、Naip5は、レジオネラ感染細胞に生じる刺激の種類に応じて細胞の生存を調節していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Naip5 is a natural resistance gene against Legionella infection in mice. We examined the functional differences among three Naip5 alleles. C57BL/6 Naip5 restricts intracellular growth of Legionella, while A/J Naip5 do not, in RAW264.7 macrophages. Effect of Balb/c Naip5 was intermediate. After *L. pneumophila* infection, C57BL/6 and A/J Naip5 significantly promoted cell death, which was not observed in cells expressing Balb/c Naip5. C57BL/6 Naip5 induced caspase-1 activation in infected cells, whereas no substantial activation was observed in Balb/c and A/J Naip5-expressing cells. Apoptosis upon DNA damage was inhibited by C57BL/6 and Balb/c Naip5, while A/J Naip5 did not affect. Interestingly, C57BL/6 Naip5 significantly promoted, whereas Balb/c Naip5 inhibited, cell death induced by reactive oxygen species. These results indicate that Naip5 regulate cell survival by inhibiting apoptosis or by promoting pyroptosis in response to specific cellular signals.

研究分野：細菌学

キーワード：レジオネラ 細胞内寄生 インフラマソーム naip

1. 研究開始当初の背景

レジオネラはマクロファージの殺菌機構に抵抗し、その細胞内で増殖する細胞内寄生菌である。しかし、マウスのマクロファージはレジオネラを貪食して殺菌する。すなわち、マウスマクロファージは細胞内のレジオネラを認識し、細胞内増殖を抑制する機構を持っている。細胞内増殖の抑制に関与する因子(インフラマソーム構成分子群)として、宿主の Naip5 (NLR-family, apoptosis inhibitory protein), Ipaf, および Caspase-1 と、レジオネラのフラジェリン(鞭毛構成タンパク)が明らかにされているが、その分子認識機構は不明である。本研究ではまず、インフラマソーム(Naip5 複合体)を精製・単離するための細胞株を作製し、それを使用して「Naip5 複合体」を精製してその構成を明らかにする。次に、「Naip5 複合体」の全体および複合体を構成する個々の因子の機能を調べることで、「Naip5 複合体」によるレジオネラの細胞内増殖の抑制機構を推定することを目的とする。これにより、レジオネラがマクロファージ内で「どのように」宿主に認識されるかを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究ではまず、「Naip5 複合体」を精製・単離するための細胞株を作製し、それを使用して「Naip5 複合体」を精製し、その構成を明らかにする。次に、「Naip5 複合体」の全体および複合体を構成する個々の因子の機能を調べることで、「Naip5 複合体」による *L. pneumophila* の細胞内増殖の抑制機構を推定する。また、マウスのレジオネラ感染に対する自然抵抗性遺伝子 *Naip5* は多型性を有しており、マウスの系統の違いで少なくとも3種類の配列が存在する。本研究では、3種類の *Naip5* について、機能の違いも検討する。これらにより、レジオネラがマクロファージ内で「どのように」宿主に認識

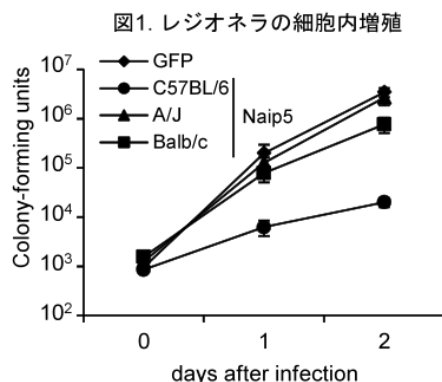
されるかを明らかにする。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス, A/J マウス、および Balb/c マウス由来の *Naip5* cDNA をそれぞれクローニングし、そのコード領域を、プロモーター、GFP 配列、G418 耐性遺伝子を含む市販の発現ベクターに連結した。これを線状化してエレクトロポレーションで RAW264 細胞に導入後、G418 で選択し、GFP-*Naip5* 融合遺伝子が染色体に組み込まれて、高レベルかつ安定に発現するクローンを選別した。選別したそれぞれのクローンの *Naip5* 発現量がそれぞれ同程度であることを確認した後、レジオネラ感染に対する応答を調べた。すなわち、レジオネラ感染細胞におけるカスパーゼ1の活性化、細胞死、および細胞内増殖の阻害の有無を検討した。カスパーゼ1の活性化は、IL-1 β の分泌量を ELISA で測定することにより数値化した。細胞死は、エチジウムホモダイマー1 (EthD-1) の取り込み、および乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の放出を指標にした。細胞内のレジオネラ生菌数を測定する際には、感染細胞の破碎液を BCYE α にプレーティングし、出現したコロニー (CFU) を計測した。

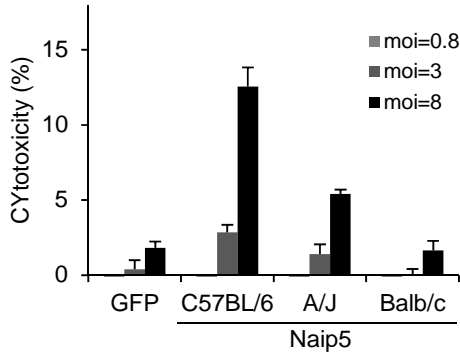
4. 研究成果

Naip5^{C57BL/6} はレジオネラの細胞内増殖を顕著に抑制したが、*Naip5*^{A/J} はまったく抑制しないこと *Naip5*^{Balb/c} は弱いながらも菌の細胞内増殖を抑制すること、がそれぞれ明らかになった(図1)。



レジオネラ感染マクロファージの細胞死は、 $Naip5^{C57BL/6}$ によって顕著に促進した。感染細胞の死は $Naip5^{A/J}$ 発現細胞でも有意に観察されたが $Naip5^{Balb/c}$ 発現細胞では認められなかった(図2)。

図2. レジオネラ感染マクロファージの細胞死



また、レジオネラ感染細胞における caspase-1 の活性化は、 $Naip5^{C57BL/6}$ 発現マクロファージでのみ認められ、 $Naip5^{Balb/c}$ および $Naip5^{A/J}$ 発現細胞では痕跡程度にしか認められなかった(図3)

さらに DNA 傷害に誘導される apoptosis は、 $Naip5^{C57BL/6}$ および $Naip5^{Balb/c}$ で抑制されたが、 $Naip5^{A/J}$ では抑制されなかった(図4)。

図3. レジオネラ感染マクロファージにおける caspase-1の活性化

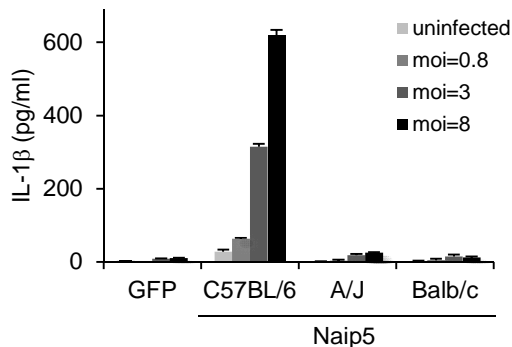
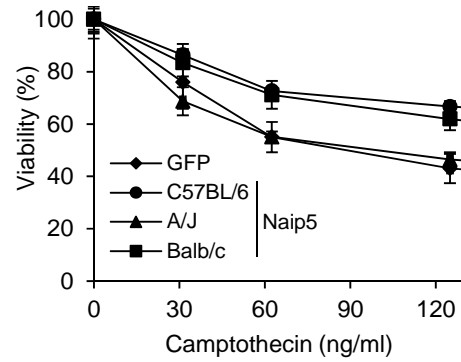


図4. DNA傷害で誘導される細胞死



以上の結果から、3種の $Naip5$ のうち、レジオネラ感染に明確に反応するのは $C57BL/6$ 由来の $Naip5$ のみであることが明らかになった。 A/J の $Naip5$ は、わずかに反応するものの、この反応はレジオネラ抵抗性には寄与しないと考えられた。また、 $Balb/c$ の $Naip5$ は $C57BL/6$ の $Naip5$ と同様にDNA傷害で誘導されるアポトーシスを抑制するが、 $C57BL/6$ とは異なり、レジオネラ感染の際のpyroptosisは誘導しないことから、 $Balb/c$ の $Naip5$ による弱いレジオネラ抵抗性は、pyroptosisには依存しないものであることが示唆された。 A/J の $Naip5$ は、apoptosisにもpyroptosisにもほとんど影響を与えなかったことから、機能自体がdefectiveであると考えられた。 $Naip5$ は、レジオネラ感染のみならず、細胞内のさまざまなストレスに対する反応に関与していると考えられる。今後は $Naip5$ が関与する細胞内ストレス反応の制御機構を明らかにしていく予定である。

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13件)

1. Kiyosuke M, Kibe Y, Oho M, Kusaba K, Shimono N, Hota T, Kan DC, Shobuike T, Miyamoto H. (2015) Comparison of two types of matrix-associated laser

desorption/ionization-time of flight mass spectrometers for the identification and typing of *Clostridium difficile*. Journal of Medical Microbiology, 64, 1144-1150 (査読あり)

2. Edagawa A, Kimura A, Kurata TK, Adachi S, Furuhata K, Miyamoto H. (2015) Investigation of *Legionella* contamination in bath water samples by culture, amoebic co-culture, and real-time quantitative PCR methods Int J Environ Res Public Health., 12, 10, 13118-13130(査読あり)

3. Shuichi Eto, Hiroshi Miyamoto, Takeo Shobuike, Iwao Noda, Takayuki Akiyama, Masatsugu Tsukamoto, Masaya Ueno, Shinsuke Someya, Shunsuke Kawano, Motoki Sonohata, Masaaki Mawatari. (2015) Silver oxide-containing hydroxyapatite coating supports osteoblast function and enhances implant anchorage strength in rat femur. J Orthop Res., 33, 9, 1391-1397(査読あり)

4. Osamu Ueda, Shinichi Tanaka, Zenzo Nagasawa, Hideaki Hanaki, Takeo Shobuike, Hiroshi Miyamoto. (2015) Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. J Hosp Infect, 90, 2, 147-155(査読あり)

5. Takayuki Murakami, Iwao Noda, Atsushi Nakahira, Hiroshi Miyamoto, Masaaki Mawatari (2015) Evaluation of the structure of Ag in thermal sprayed

Ag-containing hydroxyapatite coatings. Journal of the Ceramics Society of Japan, 123, 1440, 667-671(査読あり)

6. Kyomoto M, Shobuike T, Moro T, Yamane S, Takatori Y, Tanaka S, Miyamoto H, Ishihara K (2015) Prevention of bacterial adherence and biofilm formation on a vitamin E-blended, cross-linked polyethylene surface with a poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) layer. Acta Biomaterialia, 24, 24-34(査読あり)

7. 清祐麻紀子, 永沢善三, 堀田多恵子, 内海健、康東天、宮本比呂志 (2014) 佐賀県における抗菌薬耐性菌の検出状況 (第 2 報) —2007～2012 年における抗菌薬耐性菌サーベイランス報告— 臨床病理, 62, 6, 546—551(査読あり)

8. Tsukamoto M, Miyamoto H, Ando Y, Noda I, Eto S, Akiyama T, Yonekura Y, Sonohata M, Mawatari M. (2014) Acute and subacute toxicity in vivo of thermal-sprayed silver containing hydroxyapatite coating in rat tibia. Biomed Res Int. 2014;2014:902343. doi: 10.1155/2014/902343. Epub 2014 Mar 20. (査読あり)

9. Furuhata K., Edagawa A., Miyamoto H., Kawakami Y., Fukuyama M. (2013) *Porphyrobacter colymbi* sp. nov. isolated from swimming pool water in Tokyo, Japan. J. Gen. Appl. Microbiol., 59, 245-250(査読あり)

10. 宇木望、於保恵、永沢善三、東谷孝徳、太田昭一郎、末岡榮三朗、宮本比呂志 (2013)

質量分析装置 MALDI バイオタイパーによる血液培養陽性ボトルからの直接迅速同定法に関する検証. 臨床病理, 61, 3, 224-230(査読あり)

11. M.L.M.A.W. Weerasekara, Noriko Ryuda, Hiroshi Miyamoto, Toru Okumura, Daisuke Ueno, Koichi Inoue, Takashi Someya. (2013) Double-color fluorescence in situ hybridization (FISH) for the detection of Bacillus anthracis spores in environmental samples with a novel permeabilization protocol. Journal of Microbiological Methods, 93, 3, 177-184(査読あり)

12. 枝川亜希子, 木村明生, 三輪由佳, 田中英次, 足立伸一, 宮本比呂志 (2013) レジオネラ検査る過濃縮法におけるメンブランフィルター材質の回収率比較. 防菌防黴学会雑誌, 41, 2, 63-66(査読あり)

13. Akiyama T, Miyamoto H, Yonekura Y, Tsukamoto M, Ando Y, Noda I, Sonohata M, Mawatari M. (2013) Silver Oxide-Containing Hydroxyapatite Coating Has In vivo Antibacterial Activity in The Rat Tibia. Journal of Orthopedic Research, 31, 8, 1195-1200(査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

1. 枝川亜希子, 木村明生, 田中英次, 足立伸一, 宮本比呂志. アメーバ共培養法を用いた浴槽水中に存在するレジオネラ属菌汚染実態の解明. 日本防菌防黴学会第42回年次大会, 2015.9.1-2. 大阪

2. 船島由美子, 永沢善三, 宮本比呂志. Microwave を利用した迅速抗酸菌染色法の検討. 第27回臨床微生物迅速診断研究会総

会, 2015.7.4. 金沢

3. 枝川亜希子, 木村明生, 三輪由佳, 田中英次, 足立伸一, 宮本比呂志. レジオネラ検査る過濃縮法におけるメンブランフィルター材質の回収率比較. 日本防菌防黴学会第41回年次大会, 2014, 9.24-25. 東京

4. 菫蒲池健夫, 片桐菜々子, 久木田明子, 宮本比呂志. ヒト細胞におけるレジオネラ感染時のヒト NAIP の機能; 第87回日本細菌学会総会, 2014. 3. 26-28. 東京

5. 片桐菜々子, 菫蒲池健夫, 久木田明子, 宮本比呂志. レジオネラ自然抵抗性遺伝子によるマクロファージの生存調節; 第67回日本細菌学会九州支部総会, 2014.9.5-6. 鹿児島

〔図書〕(計5件)

1. 宮本比呂志. 緑膿菌とブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌(2013)吉田眞一, 柳雄介, 吉開泰信(編), 戸田新細菌学(改訂34版), 南山堂, 東京, 265-274

2. 宮本比呂志. 炭疽菌とバシラス属の細菌(2013)吉田眞一, 柳雄介, 吉開泰信(編), 戸田新細菌学(改訂34版), 南山堂, 東京, 366-372

3. 宮本比呂志. ジフテリア菌とコリネバクテリウム属(2013)吉田眞一, 柳雄介, 吉開泰信(編), 戸田新細菌学(改訂34版), 南山堂, 東京, 410-418

4. 宮本比呂志. 職域におけるレジオネラ症対策(2013)小木和孝ら(編)産業安全保健ハンドブック.(財)労働科学研究所, 神奈川, 954-955

5. 宮本比呂志. 生物的健康障害要因とそ

の対策 7. レジオネラ (2013) 産業保健マニュアル第 6 版, 南山堂, 東京, 323-325

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 比呂志 (MIYAMOTO HIROSHI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40229894

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

菖蒲池 健夫 (SHOBUIKE TAKEO)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：70336113