

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861757

研究課題名(和文)PRIPを介したオートファジーによる感染細菌排除機構の解明

研究課題名(英文)PRIP mediates autophagic elimination of intracellular bacteria.

研究代表者

原田 佳枝 (Harada, Kae)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：60432663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PRIP(PLC-Related catalytically Inactive Protein)はオートファジーマーカーLC3と相互作用し、アミノ酸飢餓によるオートファジーを調節する分子である。本研究では、黄色ブドウ球菌感染時におけるオートファジーにおけるPRIPの機能を解析した。その結果、PRIP遺伝子欠失(Prip-KO)ではオートファゴソーム数の増加を認め、細菌を包含する未成熟なオートファゴソームが蓄積することが分かった。以上の結果より、PRIPはオートファゴソームのリソソーム融合過程に関与し、オートファジーを介した細菌感染防御機構を調節していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：PRIP (PLC-related catalytically inactive protein) interacts with both LC3 and GABARAP which are modulators of autophagy. We previously reported that PRIP regulates autophagic pathway triggered by amino-acid starvation. In this study, we explored autophagic pathway in PRIP-deficient (Prip-DKO) cells infected with *Staphylococcus aureus*. LC3-positive autophagosome-like vacuoles (SACAVs) in Prip-DKO cells enclosed more *S. aureus* than wild-type cells, suggesting that *S. aureus* proliferates in the SACAVs of Prip-DKO cells. Then, autophagic flux was analyzed using an RFP-GFP-tagged LC3 and a lysosomal dye. Autophagosome maturation, the fusion between autophagosome and lysosome, was significantly inhibited in Prip-DKO cells. These data indicate that PRIP mediates the fusion of SACAVs with lysosomes and is a novel autophagy modulator which combats infection of pathogenic bacteria in host cells.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：オートファジー 細菌感染 微生物

1. 研究開始当初の背景

近年、非貪食性の細胞に細菌が侵入すると、オートファジー系で捕獲・分解されるという新たな異物排除機構が明らかとなり新たな免疫機構として注目を集めている。オートファジーでは、不要になった細胞小器官等細胞自身の一部または細胞内に侵入した病原体等が、哺乳類では LC3 (microtubule associated protein light chain 3) を含む二重膜からなるオートファゴソームによって包まれ、それがリソソームと融合して分解される。その一方、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) を含む一部の病原体は、オートファゴソームに取り込まれると、そこを自己増殖の場として利用し、オートファジーの本来の分解排除機構とは逆の結果を招くこともあり、様々な疾患の原因となりうる可能性も示唆されている。そのため、新しい感染防御機構を考える上でその機序解明が切望されている。

申請者らの研究グループが解析を進めている PRIP (PLC-related catalytically inactive protein) は、新規の イノシトール 1,4,5-三リン酸[Ins(1,4,5)P₃] 結合タンパク質である。この分子は、ホスホリパーゼ C (PLC) - δ 1 と類似の一次構造を有するが、PLC 活性を持たなかった。PRIP は InsP₃/Ca²⁺シグナル調節や、GABARAP と結合して GABA シグナリングに参与する。さらに我々は、GABARAP 分子が LC3 のホモログであることに着目して調べたところ、PRIP と LC3 は結合することが分かった。

そこで、我々は PRIP がオートファジーを制御している可能性に気付き、まずアミノ酸飢餓刺激によるオートファジーと PRIP の関係をしらべた。その結果、PRIP 遺伝子欠失 (*Prip*-DKO) 細胞では飢餓刺激によるオートファゴソームが増加していることが分かった。しかし、その変化がオートファジーのどの段階の違いによるものなのかは不明なままであった。さらに、細菌感染によるオートファジーと PRIP との関係については、まだ研究されておらず、解明する必要があったので、本研究により明らかにすることにした。

2. 研究の目的

PRIP のターゲットが *S. aureus* 感染刺激によるオートファジー経路のなかで何処にあるか明らかにする。

まず、PRIP により、オートファジーを介した細菌排除に変化があるか調べる。さらにその変化がオートファジーのどの段階で生じているか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Prip*-DKO MEF の調整

野生型、*Prip*-DKO マウスより各々胎児繊維芽細胞 (MEF) を調整して実験に使用した。

(2) オートファゴソーム形成・成熟過程の可視化

RFP-LC3、RFP-GFP tandem-tagged LC3 を MEF に一過性に発現させ、オートファゴソーム形成・成熟過程の可視化した。RFP-GFP tandem-tagged LC3 を発現させた細胞では、オートファゴソームの蛍光の変化によりオートファゴソームが可視化できる。細胞への遺伝子導入は Amaxa Nucleofector 4D (Lonza, Basel, Switzerland) を使用した。

(3) *S. aureus* 感染実験

15% FBS/DMEM/抗生剤不含培養液で培養した MEF に対し、Trypase Soy Broth にて振とう培養した *S. aureus* を培養液に添加し、細胞と共培養した。途中感染開始から 1.5 時間後、培養液を 100 μ g/ml ゲンタマイシン含 /15% FBS/DMEM に変え、細胞外の細菌を不活化してさらに培養を続けた。培養後の細胞の固定には 4% パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝生理食塩水を使用した。細菌の可視化には DAPI、酸性オルガネラの検出には LysoTracker (Life Technologies, Carlsbad, CA) を各々使用した。

(4) 細胞の観察

固定した細胞の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i、オリンパス、東京) を用いた。生細胞のタイムラプス観察時には、細菌感染開始から 1.5 時間後に細胞外の菌体を Lysostaphin (和光純薬、大阪) で除去した後、フェノールレッド不含 DMEM/15% FBS に培養液を交換し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス、大阪) を用いて観察した。観察結果解析には FV10-ASW (オリンパス、東京)、BZ analyzer (キーエンス、大阪) を用いた。

4. 研究成果

(1) *Prip*-DKO 細胞ではオートファジーによる *S. aureus* 排除は抑制されている。

Prip-DKO MEF に RFP-LC3 を遺伝子導入して発現させ、*S. aureus* 感染によるオートファジー誘導実験を行うと、細菌を含む RFP-LC3 陽性の autophagosome-like vacuoles (SACVs) は野生型 MEF に比べて巨大化し、1細胞あたりの細胞内の細菌数も増加していた(図1)。すなわち、PRIP 遺伝子が欠失すると *S. aureus* の排除が抑制され、細胞内で増殖することが分かった。

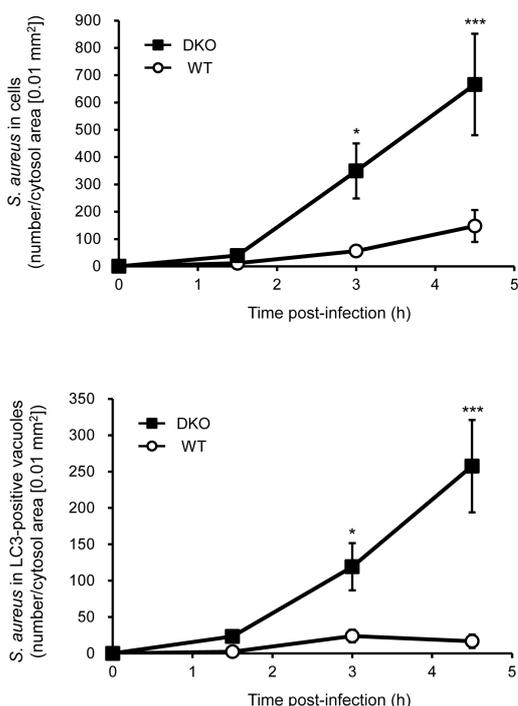


図1：1細胞内の *S. aureus* の数(上)と1細胞あたりの SACAV 中にある *S. aureus* の数(下)のグラフを示す。*Prip*-DKO MEF では、細胞あたりの細菌数も多く、SACAV にふくまれる細菌数も多いので、オートファジーによる菌の排除が抑制され、細菌内で増殖している(Harada-Hada et al., 2014 より引用)。

(2) *Prip*-DKO 細胞では SACVs とリソソームとの融合の障害により酸性化が抑制される。

次に MEF に RFP-GFP LC3 を発現させ、タイムラプス観察を行なった。野生型細胞では、LC3 陽性 SACVs の GFP 蛍光が 60 分程度で消光し、オートファゴソームがリソソームと融合することが分かった。しかし、*Prip*-DKO MEF では、GFP の消光は 2-3 時間経っても観察出来ず、SACVs とリソソームとの融合が著しく障害されることが分かった(図2)。アミノ酸飢餓刺激時において、Rab7 はオートファゴソームとリソソームの融合を促すといわれている。今回、*Prip*-DKO MEF では Rab7 が野生型 MEF よりも SACVs に多く局

在していた。また、LysoTracker を用いて酸性オルガネラ(リソソーム)を可視化すると、*Prip*-DKO MEF では、SACVs の酸性化が抑制されていることが明らかとなった。

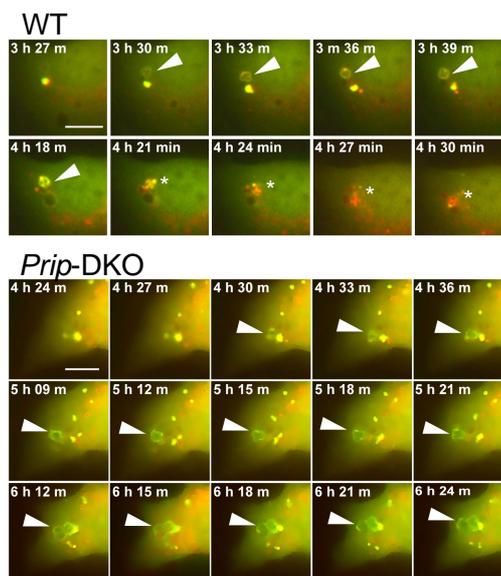


図2：右・オートファゴソームの GFP シグナルは野生型 MEF では成熟して pH が下がると消失するため、黄色のオートファゴソームが赤色に変化してオートリソソームになる。一方、*Prip*-DKO MEF ではオートファゴソームのままである。図内の白い矢尻はオートファゴソーム、アスタリスクはオートリソソームを示す(Harada-Hada et al., 2014 より引用)。

以上の結果より、PRIP はオートファゴソームのリソソーム融合過程に関与し、オートファジーを介した細菌感染防御機構を調節していることが明らかとなった。今後はオートファゴソーム成熟過程にターゲットを絞り、その分子メカニズムを解明していく。

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 5 件)

- (1) Harada-Hada K, Hong G, Abekura H, Murata H. Evaluation of the efficiency of denture cleaners for removing denture adhesives. Gerodontology, ger.12183, 2015 (査読有).
- (2) Okumura T, Harada K, Oue K, Zhang J, Asano S, Hayashiuchi M, Mizokami A, Tanaka H, Irifune M, Kamata N, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) regulates lipolysis in adipose tissue by modulating the

phosphorylation of hormone-sensitive lipase. PloS one, 9 (6), e100559, 2014 (査読有).

- (3) Asano S, Nemoto T, Kitayama T, Harada K, Zhang J, Harada K, Tanida I, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) controls KIF5B-mediated insulin secretion. Biol Open, 3, 463-74, 2014 (査読有).
- (4) Harada-Hada K, Harada K, Kato F, Hisatsune J, Tanida I, Ogawa M, Asano S, Sugai M, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. PloS one, 9 (5), e98285, 2014 (査読有).
- (5) Umebayashi H., Mizokami A., Matsuda M., Harada K., Takeuchi H., Tanida I., Hirata M., Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein, a novel microtubule-associated protein 1 light chain 3-binding protein, negatively regulates autophagosome formation. Biochem Biophys Res Commun., 432(2), 268-274, 2013 (査読有).

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 兼松隆、原田佳枝. PRIP はオートファジー系を介した黄色ブドウ球菌排除を促進する. 第 88 回日本細菌学会総会 (岐阜). 2015 年 3 月 26 日.
- (2) Harada-Hada K, Harada K, Asano S, Sugai M, and Kanematsu T. PRIP participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. 第 47 回広島大学歯学会総会 (広島). 2014 年 6 月 21 日.
- (3) 原田佳奈、原田佳枝、兼松隆. オートファジー系を介した黄色ブドウ球菌排除機構における PRIP の役割解明研究. 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (大阪). 2014 年 8 月 9 日.
- (4) 原田佳枝、原田佳奈、兼松隆. *Prip* 欠損 MEFs における autophagosome と lysosome の融合抑制. 第 87 回日本生化学会大会 (京都). 2014 年 10 月 16 日.
- (5) 原田佳枝、兼松隆. PRIP は *Staphylococcus aureus* を包含するオートファゴソームの

成熟を制御する. 第 55 回歯科基礎医学学会学術大会・総会 (岡山). 2013 年 9 月 22 日.

- (6) 張君、大植香菜、原田佳枝、北山友也、兼松隆. Genetic deficiency of PRIP induces impaired adipogenesis. 第 86 回日本生化学会大会 (横浜). 2013 年 9 月 11 日.

〔その他〕

広島大学・細胞分子薬理学ホームページ
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/shiyaku/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 佳枝 (HARADA KAE)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：60432663

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし