

オートファジーによる細胞内侵入性細菌の排除機構の解析と応用

研究課題名：オートファジーによる細胞内侵入性細菌の排除機構の解析と応用

東京大学医科学研究所 附属感染症国際研究センター 感染制御部門 助教授

中川 一路

はじめに

生体内に侵入した病原性細菌は、通常貪食細胞によって捕捉され、生体内より排除される。このような貪食細胞は、取り込んだ病原性細菌をファゴソーム内に取り込み、その後リソソームとの融合を経て消化することにより、病原性細菌の生体からの排除を行っている。ところが近年、多くの病原性細菌で、非貪食系の上皮細胞などの細胞内に侵入していることが明らかにされてきた。通常好中球などの貪食細胞に補食された病原細菌は、食胞（ファゴソーム）に取り込まれ、やがてリソソームとの融合によって消化される。それでは、非貪食系細胞の細胞質内に脱出した菌はどのように消化・排出されているのであろうか？細胞には、分解機構としてファゴソーム-リソソーム系やユビキチン系以外に、生理的に細胞内小器官や巨大タンパク質を分解するために利用されている自食作用（オートファジー）というメカニズムが存在している。本研究では、このオートファジーが細胞質内に侵入した病原性細菌の排除機構として機能しているのかどうか、またどのようなメカニズムで菌を認識して排除しているのかについて解析し、感染防御機構におけるオートファジーの役割を明らかにすることを目的とする。

研究結果と考察

(1) 細胞内に侵入するグラム陽性菌に対するオートファジーによる感染防御機構について

A群レンサ球菌感染症の発症には本菌の宿主への付着・定着因子が重要であることが示されているが、宿主細胞への付着・侵入には、菌体表層にあるMタンパクや、フィブロネクチン結合タンパクなどの複数のタンパク成分や、ヒアルロン酸で構成される夾膜が関与していることが報告されている。ところが、A群レンサ球菌は、細胞内に高頻度で侵入することが報告されているものの、他の細胞内寄生性細菌の様に細胞内で増殖することはない。そこで、A群レンサ球菌の細胞内での動態とオートファジーの関与について解析を行った。HeLa細胞にA群レンサ球菌を感染させたところ、感染後1時間からオートファゴソームの膜マーカーであるLC3陽性の膜構造に覆われ、経時的に連鎖している菌を包む様に巨大化した。感染後4時間で菌体を含むLC3陽性膜構造のほぼ全てがリソソームマーカーであるLAMP1陽性となり、リソソーム酵素阻害剤であるロイペプチンの添加により細胞内の菌数の減少が抑制された。さらに、オートファゴソーム形成に必要なAtg5遺伝子を欠失させたMEF細胞にA群レンサ球菌を感染させたところ、菌の分解が著しく抑制された。これらの結果は、細胞内に侵入したA群レンサ球菌の多くがオートファゴソーム様構造に取り込まれ、その後その構造とリソソームの融合によって分解されていることを示唆している。

また、オートファジーは細胞質内の分解機構であることから、A群レンサ球菌が細胞質内に脱出しているのか否かについて検討を加えた。A群レンサ球菌のストレプトリシンO（SLO）遺伝子



図1. SLO欠失株はオートファゴソーム内に取り込まれない。EGFP-LC3を発現させたHeLa細胞を感染後、抗EEA-1抗体で染色した。

破壊株を作製し、細胞質への脱出とオートファジーによる捕獲について検討を加えた。SLO 遺伝子破壊株では、感染後3時間を経過した時点でもエンドソーム内に留まっているのに対して、親株では速やかに細胞質への移行およびオートファジーによる捕獲が認められた。これらの結果は、A群レンサ球菌はSLOを用いて細胞質に脱出できるが、脱出した菌は選択的にオートファジーにより取り込まれることを示している（図1）。すなわち、オートファジーは細胞質に逃避したA群レンサ球菌を選択的に捕獲・分解していることが明らかとなった。

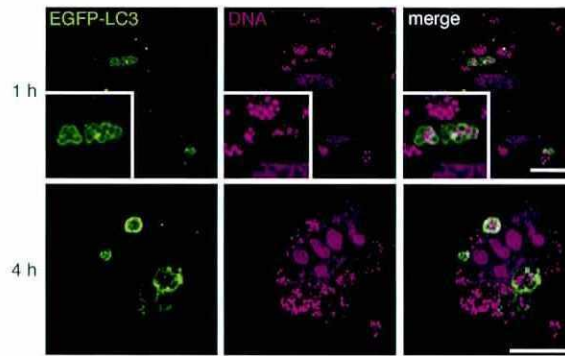


図2. HeLa細胞内に侵入し、オートファゴソーム内に取り込まれる *S. aureus* COL 株。
感染1時間でブドウ球菌の形態を表すオートファゴソーム内に菌が取り込まれている。
感染4時間後にはオートファゴソームは巨大化している。Bar: 10 μ m。

次に、黄色ブドウ球菌を用いて細胞内侵入性およびオートファゴソームによる分解について検討した。供試した黄色ブドウ球菌12株全てで細胞内侵入性が認められ、いずれも巨大なオートファゴソーム内に菌が捕獲されていた。今回用いた12株の黄色ブドウ球菌は、全て分離場所および発症疾患が異なるものを用いているため、黄色ブドウ球菌も細胞内に侵入し、オートファジーのターゲットとなることを示していると考えられる。

(2) オートファジーにより認識される細菌成分と細胞因子について

A群レンサ球菌と黄色ブドウ球菌が細胞内に侵入した後にオートファジーにより捕獲されたが、なぜ“非特

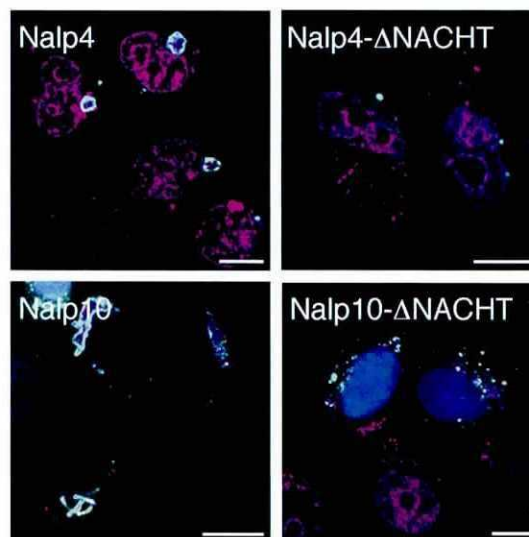


図3. Nalp4, Nalp10のNACHTドメイン欠失体導入細胞でのオートファゴソームの形成阻害。Barは10 μ m。

異的”な細胞質の分解システムであるオートファジーが“特異的にこれらの菌を認識して捕獲することができるのか”についてさらに検討を加えた。その結果、A群レンサ球菌の菌体表層の細胞壁成分がオートファジーにより認識されていた。この菌体成分を認識してオートファジーを誘導する細胞成分を明らかにするために、細胞質内の菌体成分認識分子であるNod-LRRファミリー分子に着目してその関与の解析を行った。Nod-LRRファミリー分子に網羅的にmiR-RNAiによるノックダウン系を確立した。その結果、Nalp4, Nalp10分子のノックダウン、さらにNACHTドメインの欠失体の強発現にて効果的にオートファジーの誘導の抑制、および菌の分解の抑制が認められたことから、細胞内では菌体の細胞壁成分を認識してオートファジーが選択的に誘導されていることが明らかとなった。

● 今後の展望

A群レンサ球菌や黄色ブドウ球菌では、その細胞壁を構成する成分が、細胞内の菌体成分認識分子であるNalp4やNalp10によって認識されて、オートファジーによって捕獲される行程が少しずつ明らかとなってきた。残念ながら、オートファジーにより認識される最小単位や、どのようにオートファジーといった細胞内の膜の新生システムを活性化するのかについては明らかにすることはできていないが、さらに詳細な変異株の解析と、Nalpの下流に位置する分子を明らかにすることで、新たな展開が得られると考えている。また、細胞内の菌体成分認識分子であるNalpでは、その存在や発現パターンなどは明らかとされているものの、機能はほとんど明らかとされておらず、その使い分けや、Nod1, Nod2といった既存のレセプターとの機能の使い分け、菌種をどのように分別して認識しているのかといった点も明らかにできると考えている。特に、Nalp4, Nalp10といった分子は、様々な外的刺激により誘導される炎症反応を抑制する遺伝子として機能することが報告されており、炎症反応の惹起とオートファジーの使い分けといった細胞のもつ異物認識システムの新たな側面を明らかにしたいと考えている。

主要論文リスト

1. Kato, T., Kawai, S., Nakano, K., Inaba, H., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Tsuda, K., Omori, H., Ooshima, T., Yoshimori, T., Amano, A. (2006) Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. *Cell. Microbiol.* In press.
2. Amano, A., Nakagawa I., Yoshimori, T. (2006). Autophagy in innate immunity against intracellular Bacteria. *J. Biochem (Tokyo)*, 140: 161-166.
3. Nakagawa, I., Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A. (2006) Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect. Immun.* **74**: 3773-3782. Nakagawa I., Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A. (2006) Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect. Immun.* **74**: 3773-3782.
4. Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T. (2004) Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*. 2004 **306**: 1037-40.
5. Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S., Hamada, S. Transcriptome analysis and gene expression profiles of early apoptosis-related genes in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. (2004) *Cell Microbiol.* **6**:939-52.