

論文内容の要旨

論文題目 A 群レンサ球菌感染による細胞死とオートファジー制御機構の解析

氏名 相川 知宏

【背景】

Streptococcus pyogenes (group A streptococcus: GAS) は急性咽頭炎や急性扁桃炎、猩紅熱、リウマチ熱、急性糸球体腎炎、毒素性ショック症候群などの起因菌である。本菌は上皮細胞に付着・侵入することで感染を開始するが、一方で感染細胞も炎症応答、細胞死、オートファジーなどを誘導し、これに対抗しようとする。本研究においては、GAS 感染によって誘導される細胞死とオートファジーに焦点を当て、その制御機構の解明を試みた。

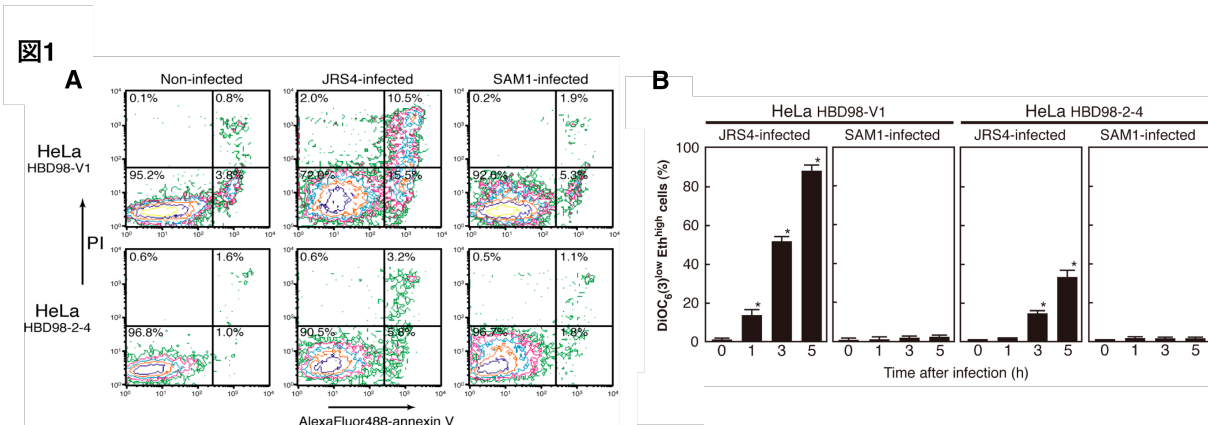
1. A 群レンサ球菌感染によって誘導される細胞死制御機構の解析

【目的】

当研究室ではこれまでに、GAS の上皮細胞への侵入によって細胞死が誘導されること、またこの細胞死がミトコンドリアの機能異常によって誘導されることを明らかとしている。しかしながら、GAS の上皮細胞への侵入からミトコンドリアの機能異常を介して最終的に細胞死が誘導されるまでの詳細な機構は明らかとされていない。そこで本研究では GAS 感染による細胞死とその誘導機構についてより詳細な解析を試みた。

【結果・考察】

GAS の基準株である JRS4 株の HeLa 細胞への感染によって、細胞死および活性酸素種 (ROS) 産生の増加 (図 1A, B), さらにミトコンドリア機能異常として膜電位の低下 (図 1B), 及び caspase-3/-9 の活性化 (図 1C, D, E) が認められた。一方で、JRS4 株のフィブロネクチン結合タンパク質を破壊し上皮細胞への結合能を欠失させた変異株である SAM1 株の感染ではこれらの変化は認められなかった。細胞死抑制因子である Bcl-2 を強発現させた HeLa 細



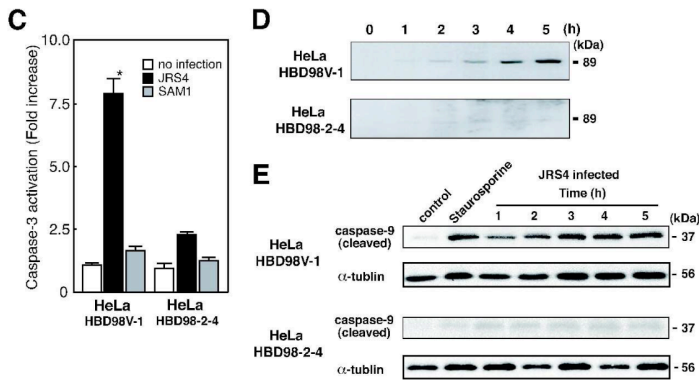


図2

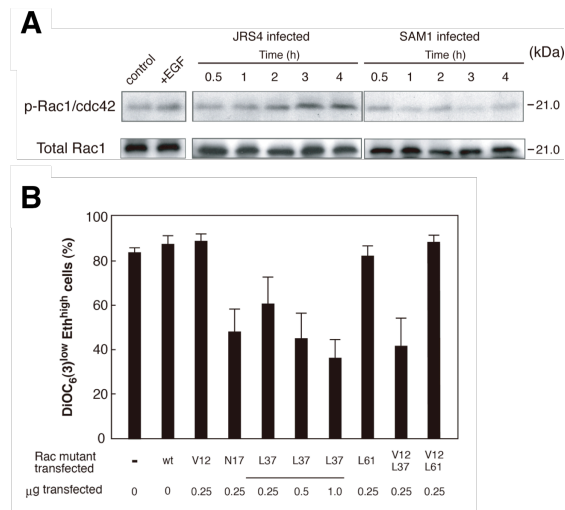


図3

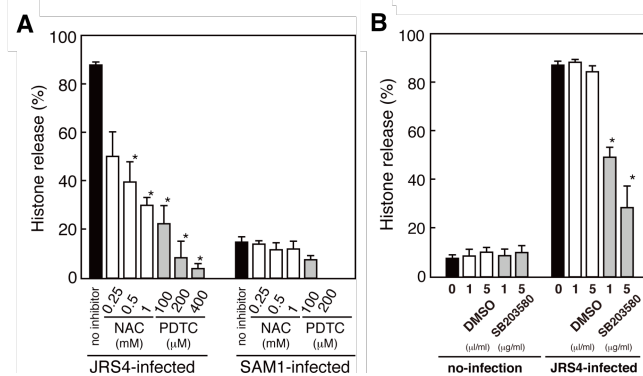
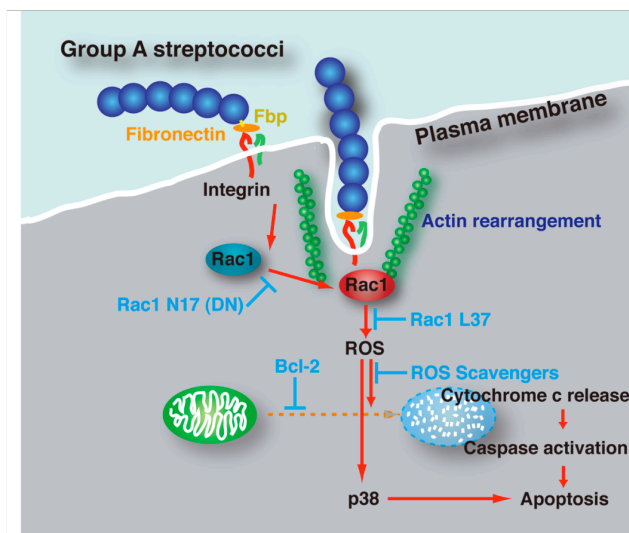


図4



胞 (HBD98-2-4) においては、JRS4 株の感染によっても細胞死、ROS 産生、およびミトコンドリアの機能異常は顕著に抑制された (図 1)。

GAS の細胞内侵入によって、small GTPase のひとつである Rac1 の活性化が認められた (図 2A)。この Rac1 の活性化は、GAS

侵入部位のアクチン再重合に関与していた。さらに、Rac1 は NADPH oxidase を活性化することで ROS 産生を誘導することが知られているが、Rac1 の L37 変異体を強発現させた HeLa 細胞においては、GAS 感染による ROS 産生は顕著に抑制された (図 2B)。GAS 感染による細胞死は、ROS 阻害剤である NAC あるいは PDTC で処理した HeLa 細胞においては顕著に抑制された (図 3A)。また GAS 感染によって細胞内では p38MAPK の活性化が認められた。興味深いことに、p38MAPK の阻

害剤である SB203580 で処理された HeLa 細胞では、GAS 感染による細胞死は顕著に抑制され、さらに p38MAPK の活性化は ROS 阻害剤である PDTC 処理により抑制された (図 3B)。

これらの結果から、GAS の上皮細胞への侵入によって活性化した Rac1 は、NADPH oxidase を活性化させることで ROS 産生を誘導することが明らかとなった。さらに、細胞内の ROS 産生の増加によって、ミトコンドリアの機能異常が生じ、また同時に p38MAPK が活性化されることで、最終的に細胞死が誘導されることが明らかとなった (図 4)。

2. A群レンサ球菌感染感染における新規 Nod-like receptor NLRX1によるオートファジー制御機構の解析

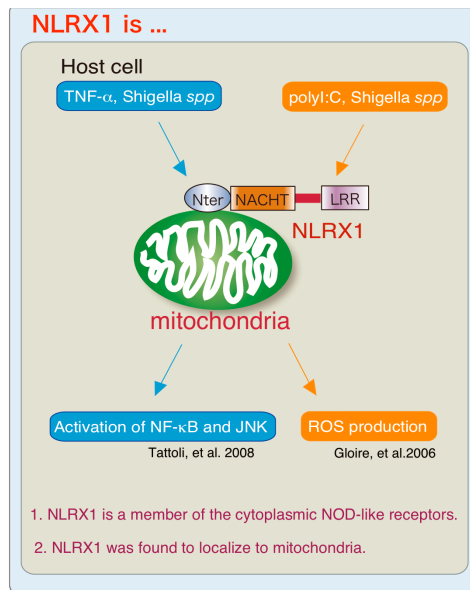
【目的】

細胞内に侵入した GAS に対して、宿主細胞はオートファジーを誘導する。細胞質中に脱出した GAS はオートファゴソームによって捕獲された後、オートファゴソームとリソソームの融合によって形成されたオートリソソームによって分解される。近年、細胞内での菌体認識およびオートファゴソームの誘導には Nod (nucleotide-binding oligomerization

domain)-like receptors (NLR) が重要であることが報告されている。

近年、新規の NLR 分子として NLRX1 が報告された。NLRX1 は NLR の中で唯一ミトコンドリアに局在し、N 末端にミトコンドリアをターゲットとした配列を保有している (図 5)。NLRX1 はミトコンドリアのマトリックスへ局在を変化させることで、ミトコンドリアにおける Reactive oxygen species (ROS) の産生を促進することが報告されている。一方で、NLRX1 と GAS 感染によって誘導されるオートファジーの関連については現在までに報告されていない。そこで本研究では分子化学的手法を用いて NLRX1 によるオートファジー制御機構の解析を試みた。

図5



【結果・考察】

NLRX1 を強発現した HeLa 細胞においては、JRS4 株の感染によって誘導されるオートファゴソームの形成が促進された。一方で、NLRX1 をノックダウンした細胞ではオートファゴソームの形成が抑制された (図 6A)。NLRX1 強発現細胞ではオートリソソームの形成も感染の早い段階で起き、また細胞内の菌数も有意に低下した (図 6B, C)。

図6A

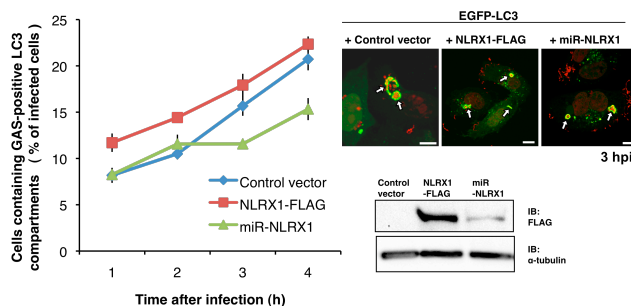


図6B

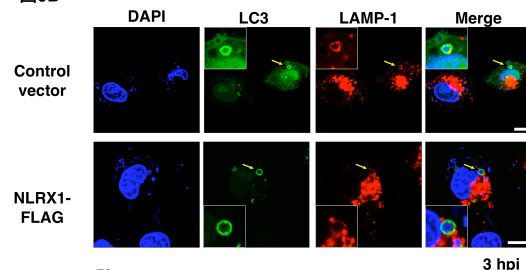


図6C

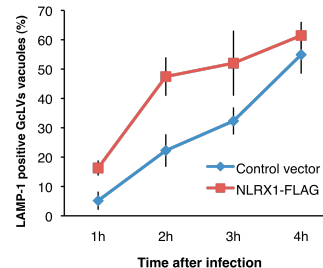
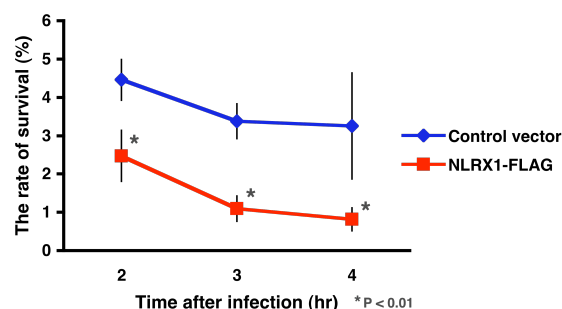


図7

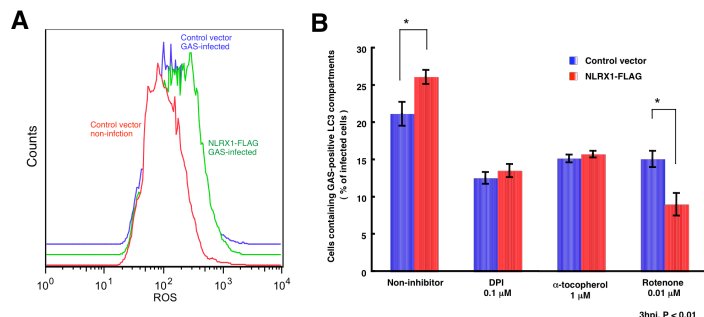
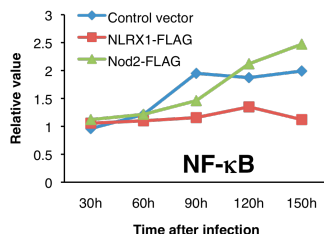


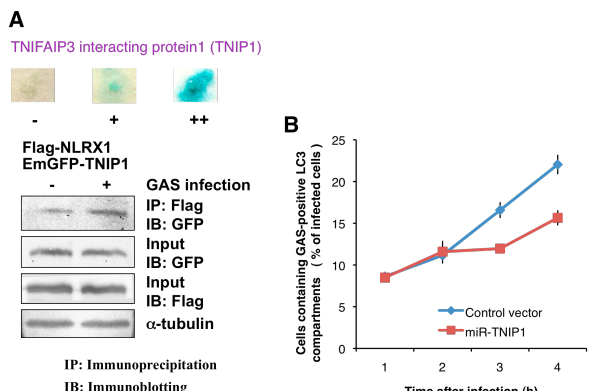
図7A)のROS産生の増加が観察された。これまでにROS産生の増加によって、LC3(オートファゴソーム膜の成分)のファゴソーム膜へのリクルートが促進されることが報告されている。本研究においても、ROS阻害剤によって処理した細胞ではオートファゴソームの形成は抑制された(図7B)。ROS阻害剤のうちRotenone(ミトコンドリアI複合体阻害剤)で処理した細胞においては、NLRX1強発現条件下でのオートファジーの形成が著しく抑制された(図7B)。GAS感染によってNADPH oxidaseを介して細胞内のROS産生が増加することは前項で述べたが、本研究の結果から、NLRX1はミトコンドリアからのROS産生を増加させることでオートファジーの誘導を促進していることが示唆された。

図8



また、NLRX1強発現細胞においては、転写因子の1つであるNF-κBの活性が抑制された(図8)。これまでにNF-κBの活性化抑制によって、TNF-αによるオートファジーの誘導が促進されることが報告されている。これに関連して、酵母two-hybrid systemを用いてNLRX1と相互作用する分子を探索したところ、NF-κBの活性を抑制する分子として、TNIP1(別名ABIN1: A20

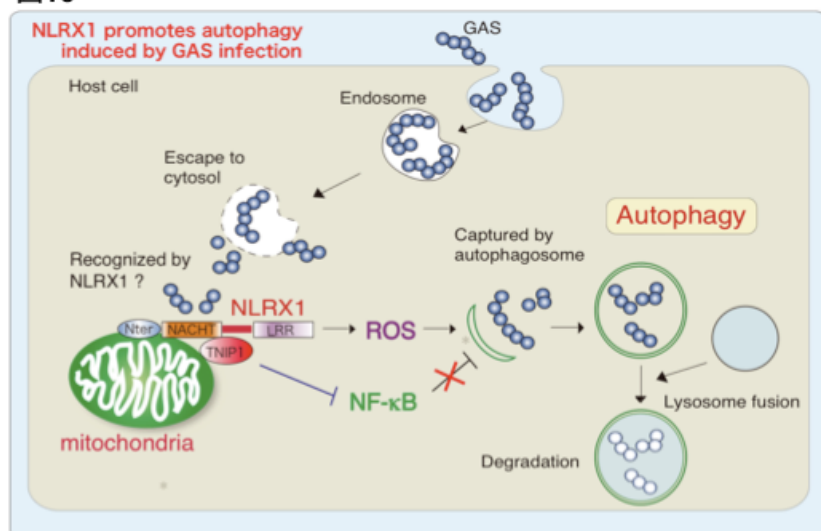
図9



binding inhibitor of NF-κB activation-1)を見いだした(図9A)。TNIP1をノックダウンした細胞においては、GAS感染によるオートファジーの誘導が抑制された(図9B)。

これらの結果から、細胞内の菌体認識機構は未だ不明であるものの、NLRX1はミトコンドリアからのROS産生を増加させることでオートファゴソーム形成を促進すると共に、TNIP-1との相互作用によってNF-κBの活性

図10



を抑制することでオートファジーを促進していることが明らかとなった(図10)。