



Title	A群レンサ球菌におけるオートファジーによる細胞内侵入性細菌の捕食メカニズムに関する研究
Author(s)	船尾, 純子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47601
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	船 尾 純 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 0 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学 位 論 文 名	A 群レンサ球菌におけるオートファジーによる細胞内侵入性細菌の捕食 メカニズムに関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 大 嶋 隆 (副査) 教 授 天 野 敦 雄 講 師 林 美 加 子 講 師 寺 尾 豊

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

オートファジー（自食作用）とは細胞内の小器官や巨大タンパク質のような細胞内の自己成分を非特異的に分解する機構である。細胞内成分を取り囲んだ膜構造物は、オートファゴソームと呼ばれ、最終的にはリソソームと融合することによって内容物を分解する。一方、一部の病原性細菌が上皮細胞などの非貪食性細胞に侵入して、エンドソームを経由して分解されることが明らかになっている。しかし最近になって、細胞内に侵入した後、オートファジーによって捕獲、分解される細菌の存在が報告されている。小児の咽頭炎、扁桃炎の主要な病原性細菌である A 群レンサ球菌（Group A streptococci : GAS）は、高頻度に上皮細胞内に侵入するものの、オートファジーによって捕獲・分解されることが報告されている。しかし、どのような経路をたどってオートファジーによる捕獲を受けるかについては明らかにされていない。GAS が産生する溶血毒素であるストレプトリシン O（SLO）は、リステリア菌が産生するリステリオリシン O（LLO）と類似した構造を示すことが知られている。SLO および LLO は、共に cholesterol-dependent cytolysin family（CDCs）の一種であり、コレステロール依存性に細胞膜に穴をあけ、傷害を与えることで知られている。リステリア菌が LLO を用いてファゴソーム膜を破壊して細胞質へと脱出することが明らかにされていることから、GAS も同様の機構により上皮細胞内で SLO を用いてエンドソームから脱出する可能性が考えられる。本研究の目的は、GAS が上皮細胞内に侵入し、オートファゴソームに捕獲されるまでの経路の詳細を明らかにするとともに、その過程におけるエンドソームからの脱出に SLO がどのように関与するかを検討することである。

【実験方法】

1. *slo* 遺伝子破壊株と SLO 再発現株の作製

GAS JRS4 株の *slo* 遺伝子に、*slo* 遺伝子の部分断片を組み込んだプラスミドをエレクトロポレーションにより導入して *slo* 遺伝子破壊株（JRS4 Δ *slo*）を作製した。また、IPTG 誘導ベクターに *slo* 遺伝子を組み込んで作製した pOGW-SLO を JRS4 Δ *slo* 株にエレクトロポレーションにより導入して、IPTG 誘導 SLO 再発現株を得た。

2. 細胞内小器官の蛍光マーカー遺伝子の作製と蛍光免疫染色

GAS の細胞内での動態を観察するため、オートファゴソーム膜に特異的に結合する Atg8 (microtubule-associated protein light chain 3 : LC3) をマーカーとして、EGFP（緑色蛍光タンパク質）との融合タンパク質のアデノウィル

ス発現系を構築した。また初期エンドソーム・後期エンドソームにそれぞれ局在する低分子量 GTP 結合タンパクである Rab5（野生型：Rab5 WT）および Rab7（野生型：Rab7 WT）と、活性化型変異体（Rab5 DA、Rab7 DA）の mVenus（黄緑色蛍光タンパク質）との融合タンパクアデノウイルス発現系を構築した。必要に応じて、リソソームのマーカー、初期エンドソームのマーカーおよび SLO に対する抗体処理、核酸を染める臭化プロピジウム（PI）による蛍光免疫染色を行った。

3. 共焦点レーザー顕微鏡による観察と細胞内侵入生菌数の測定

LC3、Rab5 WT、Rab5 DA、Rab7 WT を遺伝子導入した HeLa 細胞に JRS4 株、JRS4 Δslo 株または SLO 再発現株を感染させて、細胞内での細菌の動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また、Rab5 WT、DA、Rab7 WT、DA を遺伝子導入した細胞においては、JRS4 株、JRS4 Δslo 株を感染させ、細胞外の菌を処理した後培地を取り除き、細胞を破碎して細胞内の生菌数を測定した。

【結果と考察】

Rab5-WT、DA を遺伝子導入した HeLa 細胞における JRS4 株感染細胞では、感染 1、2 時間後では侵入菌の約 70% が初期エンドソームに取り囲まれるが、4 時間では約 30% に減少し、初期エンドソームから細胞質内に脱出する像が観察された。一方 JRS4 Δslo 感染細胞では、感染後 1 時間では親株と同様の傾向を示したが、感染後 4 時間を経過しても膜構造物内に侵入菌の 80% 以上の菌が保持されていた。また、Rab5-DA 導入細胞において、JRS4 株を感染させたところ、生存菌数は感染 3 時間後には感染 1.5 時間後の約 30% まで減少しているのに対し、破壊株では約 80% までしか減少しておらず、菌の減少率に大きな差がみられた。一方、Rab7-WT を遺伝子導入した細胞においても同様の傾向がみられたが、生存菌数において、リソソームとの膜融合過程を亢進する Rab7-DA を遺伝子導入した細胞においては、菌株間に差がみられなかった。さらに、SLO 再発現株を感染させた細胞では、JRS4 Δslo 株と比較してオートファゴソームの形成率が有意に高く、初期エンドソームから脱出した後、オートファゴソームに捕獲される像を観察した。

【結論】

これらの結果は、GAS が初期エンドソームおよび後期エンドソームから SLO を用いて細胞質に脱出するものの、細胞質において菌がオートファジーにより効果的かつ選択的に捕獲、分解されることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、A 群レンサ球菌（GAS）が上皮細胞内に侵入し、オートファゴソームに捕獲されるまでの経路の詳細を明らかにするとともに、その過程における GAS のエンドソームからの脱出においてストレプトリシン O（SLO）がどのように関与するかについて解析したものである。その結果、GAS が初期エンドソームおよび後期エンドソームから SLO を用いて細胞質へと脱出し、エンドサイトーシスによる分解から回避しようとするものの、細胞は細胞質へと脱出してきた菌をオートファジーによって効率的かつ選択的に捕獲、分解することを示した。以上の結果は、GAS がオートファジーによって捕獲されるまでの経路について明らかにするとともに、オートファジーによる感染防御についての新たな知見を示すものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。