

学位論文

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

相川 知宏

## 目次

第1章 要旨	1
第2章 緒言	
2-1 細菌の細胞侵入と細胞内生存機構	5
Box: Trigger mechanism, Zipper mechanism	6
2-2 細菌の細胞侵入と細胞死	7
2-3 細菌の細胞侵入とオートファジー	7
2-4 A 群レンサ球菌感染症	9
2-5 本研究の目的	11
2-6 本研究の意義 ～細菌による感染症の制御を目指して～	12
第3章 GAS 感染上皮細胞における細胞死誘導機構の解析	14
3-1 GAS の細胞侵入によって誘導される細胞死と Bcl-2 による抑制	14
3-2 GAS の細胞侵入による ROS 産生と細胞死の誘導	15
3-3 GAS の細胞侵入による ROS 産生の増加とミトコンドリアの膜電位の低下	17
3-4 GAS の細胞侵入による small GTPase Rac1 の活性化	18
3-5 Rac1 によるアクチンの再構築と GAS の細胞侵入	18
3-6 Rac1 の L37 domain による ROS 産生の増加と細胞死誘導	19
3-7 ROS 阻害剤による細胞死の抑制	19
3-8 ROS による p38 MAPK の活性化と細胞死の誘導	20
考察	21
第4章 新規 Nod-like receptor NLRX1 によるオートファジー制御機構の解析	25
4-1 GAS 感染細胞における NLRX1 によるオートファジーの誘導促進	25
4-2 NLRX1 による ROS 産生の増加と NF- $\kappa$ B のダウンレギュレーション	27
4-3 NLRX1 NACHT domain を介したオートファジーの促進	28
4-4 NLRX1 NACHT domain と TNIP1 の直接相互作用による NF- $\kappa$ B の活性化とオー	

トファジーの促進	29
考察	31
第5章 総括	34
材料と実験方法	35
謝辞	43
参考文献	44
図表	55

## 第1章 要旨

*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、特に GAS の細胞侵入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

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にしている。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。

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、さらにミトコンドリア機能異常として膜電位の低下、及び caspase-3/-9 の活性化が認められた。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。

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。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。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。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。

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。

## 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

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 (NLRs) 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。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。

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。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。

NLRX1 の強発現によって細胞内の 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。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。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。

また、NLRX1 強発現細胞においては、転写因子の 1 つである NF- $\kappa$ B の活性が抑制された。これまでに NF- $\kappa$ B の活性化抑制によって、TNF- $\alpha$ 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- $\kappa$ B の活性を抑制する分子として、TNIP1 (別名 ABIN1: A20 binding inhibitor of NF- $\kappa$ B activation-1)を見いだした。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。

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- $\kappa$ B の活性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。

宿主細胞への GAS の定着と増殖には、GAS の細胞への侵入が重要であると考えられる。本研究の結果から、GAS 感染による細胞死の誘導には GAS の細胞侵入が必要であることが明らかとなった。また、GAS の侵入した細胞質内の変化として、新規 Nod-like receptor である NLRX1 がオートファジーの誘導を促進し、これによって細胞質内の GAS を効率的に除去されていることが明らかとなった。そして、GAS の細胞侵入による細胞死とオートファジーの誘導の両方に細胞質内の ROS 産生が重要

な役割を担っていることが明らかとなった. NLRX1 をはじめとする NLRs による GAS の認識機構, オートファジーに対する抵抗機構と細胞質内での生存機構, そして細胞死誘導によって破壊した細胞から脱出した GAS の運命, などの詳細は現在も不明であるが, 本研究で得られた知見が GAS 感染を分子レベルで説明し, 感染及び発症の制御に役立たれることが望まれる.

## 第2章 緒言

### 2-1 細菌の細胞侵入と細胞内生存機構

細菌は宿主内の多様な環境 (ニッチ)を利用することで生存・増殖する。細胞侵入能を有する細菌は、細胞内へと侵入することで、貪食細胞による消化、あるいは補体による分解と食作用の増強などの宿主の免疫系を回避するだけでなく、細胞質内の豊富な栄養源を利用していると考えられる。細胞侵入細菌のライフサイクルは、ファゴソームからの脱出、細胞質内での増殖、細胞質内で誘導される自然免疫応答の調節の大きく分けて3つのステージに分類される (Ray *et al.*, 2009, Alonso *et al.*, 2004, Goebel *et al.*, 2000).

細胞侵入細菌種の多くは, trigger mechanism あるいは zipper mechanism (Box, 図 1A, B)によって上皮細胞へと侵入後, 宿主細胞膜由来の一重膜小胞 (ファゴソームあるいは vacuole)によって取り囲まれ細胞質内へと移行する。これらのファゴソームは細胞質内で初期エンドソームあるいは後期エンドソーム, そしてリソソームと融合する。ファゴソームはリソソームとの融合によってファゴリソソームとなることで酸性化し, 積極的に内部の細菌を分解する (Haas, 2007)。しかしながら, *Salmonella* を代表とする細菌種の一部はファゴソームとリソソームの融合を阻害することで, あるいはファゴリソソーム内の環境を変化させることによってファゴソーム内で生存する。また, 一方でファゴソームから脱出し細胞質内で生存する細菌も存在する (Ray *et al.*, 2009, Alonso *et al.*, 2004, Goebel *et al.*, 2000, Cossart *et al.*, 2008) (図 2)。しかしながら, フォゴソームから脱出したこれらの菌にとって, 細胞質という環境もまた完全に安全な定着場所とは言い切れない。なぜなら細胞質には種々の抗菌ペプチド (Hiemstra *et al.*, 1999)や殺菌的に働く活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)が存在し (Ray *et al.*, 2009), 加えて Nod (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors (NLRs)と呼ばれる菌体認識分子が存在しているからである (Delbridge *et al.*, 2007, Kufer *et al.*, 2007)。これらの NLRs は種々のシグナル伝達経路や炎症応答を活性化させるだけでなく (Kufer *et al.*, 2007), オートファジーを誘導することで細胞質内の菌を分解・排除する (Ray *et al.*, 2009)。一方で, 一部の細胞侵入細菌は免疫系であるオートファジーを回避し, 細胞内で生存する。 *Listeria monocytogenes* (L.

*monocytogenes*)は、菌の表面タンパク質である ActA が宿主細胞の actin-related protein (Arp2/3)複合体及び vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)と結合し、それらが菌体表面へ繫留することでオートファジーの認識を免れる。つまり菌体の表面が宿主タンパク質で覆われることにより宿主細胞内でその一部のごとく擬装することによりオートファジーによる分解を回避していることが報告されている (Yoshikawa *et al.*, 2009). また, *Shigella flexneri* (*S. flexneri*)に対するオートファジーは菌体表層タンパク質の VirG が Atg5 によって認識されることによって誘導されるが、これは VirG が同じく菌体タンパク質の 1 つである IcsB によってマスクされることで阻害されることが明らかとされている (Ogawa *et al.*, 2005).

GAS については、フィブロネクチンに結合することで細胞内へと侵入し、細胞質へ脱出することが知られている。細胞質へ脱出した GAS はオートファジーによって効率的に分解されると考えられているが、オートファジーの誘導機構は現在までに明らかとされていない。

## Box

### Trigger mechanism:

*Shigella* 属あるいは *Salmonella* 属といった細菌種による宿主細胞内部からの細菌取り込み機構。これらの細菌は III 型分泌機構 (type III secretion system: TTSS)によってエフェクター分子を宿主細胞へと注入する。注入されたエフェクター分子により細胞内では大規模なアクチンの再構築が誘導され、細菌は宿主細胞内でファゴソームに取り込まれる。この細胞侵入機構は、一般的に膜のラップリングと呼ばれ、Rho ファミリーの small GTPases (Rho, Rac1, Cdc42)によって活性される (図 1A)。

### Zipper mechanism:

*Yersinia* 属や *Listeria* 属といった細菌種による宿主細胞外部からの細菌取り込み機構。これらの細菌種は自身の表層タンパク質 (adhesin)と宿主細胞の表層レセプターの結合を通して細胞と接触する。適度の膜伸張とアクチンの再構築によって細菌は宿主細胞内でファゴソームに取り込まれる (図 1B)。

## 2-2 細菌の細胞侵入と細胞死

多細胞生物の細胞死は細胞内外の種々のシグナルによって惹起される (Monack *et al.*, 1996, Darzynkiewicz *et al.*, 1997). 細胞死に関連するシグナルは, caspase と呼ばれるシステインプロテアーゼファミリーの活性化を通して伝達される. これらのシグナル伝達は, ミトコンドリアや小胞体といった細胞内小器官によって厳密に制御されていることが知られている (Tsujimoto *et al.*, 2000, Shimizu *et al.*, 2000, Zamzami *et al.*, 1995). 細胞死は主に, 生存促進性タンパク質である Bcl-2 family members (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1), 細胞死促進性タンパク質である Bax-like protein (Bax, Bak, Bok)及び BH3-only protein (Bad, Bik, Bid, Puma, Noxa)によって制御されている (Strasser, 2005). これまでに, 活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS)の活性化に伴い誘導された細胞死は, Bcl-2 の強発現によって抑制されることが報告されている (Hockenbery *et al.*, 1993).

細胞侵入細菌による細胞死の誘導については, TTSS によって細胞質内に移行された *S. flexneri* のエフェクター分子である invasion plasmid antigen B (IpaB) が caspase-1 に直接結合することでこれを活性化し細胞死を誘導することが報告されている (Hilbi *et al.*, 1998). また, *Salmonella* 属細菌においては *shigella* 属細菌の IpaB のホモログである SipB が caspase-1 に直接結合し, これを活性化させることで細胞死を誘導することが明らかとされている (Hersh *et al.*, 1999).

GAS 感染と細胞死の関連については, これまでに当研究室において, フィブロネクチンを介した GAS の上皮細胞への侵入がミトコンドリアの機能異常を誘導し, 結果として細胞死が起こることを明らかとしてきた (Nakagawa *et al.*, 2001, Nakagawa *et al.*, 2004b). 加えて, GAS 感染による細胞死の誘導については, 図 3 で示すように, GAS の細胞内への侵入が必要である (Tsai *et al.*, 1999), あるいは SLO による膜貫通孔の形成が必要である (Cywes Bentley *et al.*, 2005), といった報告があるが, 現在までに GAS 感染による細胞死の詳細な誘導機構は明らかではない.

## 2-3 細菌の細胞侵入とオートファジー

オートファジー (自食作用) は, 細胞の自己成分を細胞内消化器官であるリソソームとの融合により分解する作用と定義される.

細胞内のタンパク質分解系としては、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー系の2種類が知られている。プロテアソームが巨大タンパク質複合体による分解機構であるのに対し、オートファジーは膜ダイナミクスによる機構である。しかし、膜を介した分解系であるにもかかわらず、分泌経路などの他の膜輸送系とはその膜動態が大きく異なる (Noda *et al.*, 2002)。オートファジーが誘導されると、まず細胞質に、隔離膜とよばれる膜構造 (隔離膜またはファゴフォア) が形成され、その隔離膜が細胞質の一部を包み囲むように伸展・成長し、最後に末端同士が融合する。こうして形成された直径およそ数十～数百 nm の内膜・外膜から成る二重膜構造体をオートファゴソームとよぶ。次にオートファゴソームの外膜とリソソーム膜との融合によってオートリソソームとなる (Yoshimori *et al.*, 2008)。オートファゴソームは、中心体近くに集積しているリソソームと融合するために微小管に沿って輸送される (Kimura *et al.*, 2008)。オートリソソーム内では、リソソームの加水分解酵素群により、内膜と取り込まれた細胞質由来の物質が分解される (Yoshimori *et al.*, 2008) (図 4)。

オートファゴソームによる細胞内分解システムは、日常的な細胞の代謝回転を担う基本機能であり、恒常性オートファジーと一過性に多量に誘導される誘導性オートファジーが知られている (Cuervo, 2004, Levine *et al.*, 2004)。加えて、分化・発生などの高次生体機能やさまざまな疾患とも密接な関わりを持つことが明らかとなっている (Gurusamy *et al.*, 2009)。

オートファジーは、上記で示したように生理的条件下で誘導されるだけでなく、近年、細胞内に侵入した細菌の分解・排除を行う自然免疫機構として誘導されることが明らかとなってきた。細胞内侵入細菌に対する分解システムとしてのオートファジーは、*Mycobacterium tuberculosis* (Singh *et al.*, 2006, Vergne *et al.*, 2006), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Birmingham *et al.*, 2006, Birmingham *et al.*, 2008) など多数の細菌に対して免疫機構として機能していることが報告されている (Huang *et al.*, 2009a)。さらに、細胞内で増殖を果たす *S. flexneri* (Ogawa *et al.*, 2005) や *L. monocytogenes* (Py *et al.*, 2007, Yoshikawa *et al.*, 2009) は、オートファジーからの認識を逃れる機構を獲得していること、またオートファゴソームそのものを増殖のためのニッチとして利用する細菌がいることも報告されている (Amer *et al.*, 2005,

Rodrigues *et al.*, 2008, Romano *et al.*, 2007). つまり、細胞内では、侵入性細菌とそれを排除しようとするオートファジーの間でさまざまな攻防が繰り返されていることが明らかになりつつある。

近年、先天性免疫および後天性免疫における細胞内センサーの中心的役割を担っている Nod (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors (NLR) が注目され、NLR ファミリーとして CIITA, NLRP12, NOD1, NOD2, NLRX1 など多数が報告されている(Shaw *et al.*, 2010). これら NLR の構造は、中心部に存在する NACHT ドメインおよび C 末端に存在する Leucine-rich repeat (LRR) を特徴としている (Shaw *et al.*, 2010). 表 2 では、NLR ファミリーのうち代表的な 6 つ (CIITA, NLRP3, NLRP4, NLRP12, NOD1, NOD2, NLRX1) について、ヒト生体内のどの組織において特に高い遺伝子発現を示しているかを記載した (Reith *et al.*, 2001, Fiorentino *et al.*, 2002, Manji *et al.*, 2002, Tschopp *et al.*, 2003). これらの NLR ファミリーを代表とする細胞内レセプターは、細胞内に侵入する細菌の認識機構として重要な役割を担っていると考えられている (Saitoh *et al.*, 2010, Shaw *et al.*, 2010). 加えて、NLRs による菌体認識とオートファジーについては、グラム陽性菌を認識する細胞内レセプターである Nod1 が *L. monocytogenes* 感染に対して、またグラム陰性菌を認識する細胞内レセプターである Nod2 が *Shigella flexneri* 感染に対して応答し、菌の細胞侵入部位へ Atg タンパク質の 1 つである Atg16L1 を効率的にリクルートすることでオートファジーを制御していることが報告されている (Travassos *et al.*, 2010).

当研究室では、細胞内へ侵入した GAS がオートファジーによって効率的に分解・除去されることを報告している (Nakagawa *et al.*, 2004a). しかしながら、オートファジーの誘導に必要であると考えられる細胞内での GAS の認識機構や制御機構についての詳細は現在までに明らかではない。

## 2-4 A 群レンサ球菌感染症

最後に本研究において研究対象とした GAS について記載する。GAS (group A streptococci, *Streptococcus pyogenes*, A 群レンサ球菌) は、グラム陽性の細菌である。疫学調査によると、健康人の 10%程度から分離される (Abdissa *et al.*, 2006, Iimura *et al.*, 2006). このように広くヒトに常在菌として分布している一方で、ヒトに感染症



を引き起こす病原体でもある(Cunningham, 2000). GAS が引き起こす感染症には、皮膚の化膿性疾患や咽頭炎、扁桃炎があり、毎年世界中では数億の、日本においても例年 20 万件以上の症例が報告されている (Sanderson-Smith *et al.*, 2008). また続発性疾患として猩紅熱や糸球体腎炎、リウマチ熱などがあり、年に 1 億件前後が報告され、特に発展途上国において問題となっている (Virtaneva *et al.*, 2005). 1980 年代後半より、病態の進行が極めて早く死亡率が 50%にも及ぶ劇症型の A 群レンサ球菌感染症が先進国で報告され、日本でも年間 100 例近くが毎年のように報告されている (Stevens, 2000).

このように、非常に多彩な病態を引き起こすことが本菌感染症の特徴である. 本菌が様々な疾患の原因となる機構の解明を目指し、現在までに SF370, MGAS5005, MGAS10270, MGAS315, SSI-1, MGAS10750, Manfredo, MGAS10394, MGAS2096, MGAS9429, MGAS8232, MGAS6180, NZ131 の 13 株のゲノム配列が解読されてきた (McShan *et al.*, 2008). その結果、本菌のゲノムサイズはおよそ 1.9Mb であること、比較的小さいながら多くの病原因子を持つこと、2-8 箇所のプロファージ領域を持ち、ゲノムの約 10%以上が外来性であること、そしてこの領域に多数の病原因子がコードされているという特徴があることが明らかとなった. また、本菌は菌体表層に持つ M タンパク質によって、125 以上の型に分類されている. しかし、同じ型に分類された株間においてもゲノム内に存在するプロファージの数が異なることに加え、病態が異なることから、この M タンパク質遺伝子に基づく分類では本菌の病原性を言及するのには不十分であると考えられる (Beres *et al.*, 2007). これらの事象から、GAS に加えて、近縁種ゲノムの解読が積極的に推進されているものの、現在までのところ、疾患に特異的な遺伝子群あるいは変異遺伝子の存在などは明らかとなっていないのが現状である (McShan *et al.*, 2008).

GAS は、古くから多数の病原因子が存在していることが知られている. 本菌の菌体表層には多くのタンパク質が発現しており、菌体外へも酵素や毒素を放出している. 体内に侵入した本菌は莢膜成分であるヒアルロン酸や菌体表層にある M タンパク質、C5a ペプチダーゼ、及び SpeB やヘモリシン、ScpC, DNase を用いて白血球の貪食作用に抵抗する (Bisno *et al.*, 2003, Sumby *et al.*, 2005, Terao *et al.*, 2006, Kahn *et al.*, 2008, Zinkernagel *et al.*, 2008). これら以外にも、Streptolysin O (SLO) を用いて、

マクロファージのアポトーシスを誘導し、除去作用に抵抗をすることが報告されている (Timmer *et al.*, 2009). また、フィブロネクチン結合タンパク質やラミニン結合タンパク質、リポタイコ酸、及び上記の M タンパク質やヒアルロン酸を用いて上皮細胞へ付着し (Terao *et al.*, 2002), F1 タンパク質及び M タンパク質を用いて細胞へと侵入する (Cue *et al.*, 1997, Cue *et al.*, 2000). また菌体外へも溶血毒素である Streptolysin S (SLS), SLO や発熱毒素である Streptococcal pyogenic exotoxin, DNase などを放出しているため、細胞及び組織に対して傷害性があることが知られている (Bisno *et al.*, 2003). さらに、本菌においては、このような病原遺伝子のみでなく、過酸化物質耐性遺伝子や炭水化物の代謝に関わる遺伝子も病原性に関与することがわかってきている (Brenot *et al.*, 2005, Gryllos *et al.*, 2008). しかし、これまで本菌が糸球体腎炎を引き起こすために必要と思われていた *speB* の欠損した株が同疾患を引き起こしうることが判明するなど、未だ不明な点が多く、さらなる研究が必要と考えられる (Beres *et al.*, 2008). また、本菌が獲得してきた病原因子だけでなく、本菌と宿主との相互作用の結果が様々な病態の原因である可能性も示唆されており、菌側の病原性解析だけでなく、菌に対する宿主の機能解析もまた重要な課題となっている。

## 2-5 本研究の目的

病原細菌は宿主の自然免疫系細胞の防衛機構から逃れることによって感染を成立させる。GAS をはじめとする細菌は、貪食細胞による殺菌、抗原提示などの免疫応答から逃れるために、あるいは栄養源の豊富な細胞質での定着を図るために、上皮細胞内へと侵入し感染を拡大させると考えられる。一方でこれらの細菌が侵入した上皮細胞も炎症応答、細胞死、オートファジーなどを誘導することで対抗していると考えられる。本研究においては、GAS の細胞侵入によって誘導される細胞死とオートファジーの制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

細菌感染が細胞死を起こすことはよく知られているが、その生物学的意義についてはまだ十分に理解されていない。GAS 感染によっても上皮細胞には細胞死が誘導されるが、その詳細な誘導機構と意義については未だ明らかとされていない。本研究においては、GAS の持つ細胞侵入能こそが細胞死誘導に必要であると考え、野生

株と細胞侵入能を欠失した菌株を上皮細胞へ感染させることで、細胞死が誘導されるか否かを検討した。また、細胞侵入によって活性化される種々の細胞死関連シグナルを精査した。

感染防御機構としてのオートファジーは、現象としてはその重要性が認識されているものの、認識や誘導機構、そして炎症系等の他の免疫系との関わりについては未だ知見が少なく、全容の解明には程遠いのが現状である。その原因の一つとして、細菌種により細胞内へ侵入を果たした後の運命が大きく異なるため (Huang *et al.*, 2009a, Birmingham *et al.*, 2008), オートファジーによる影響だけを追うことが困難である点が挙げられる。加えて、一過性に現れて菌を分解するオートファジーの観察は難しく、仮にオートファジー像を捕らえられても、その現象を定量するのは困難とされている。しかし、GAS 感染モデルでは、オートファジー誘導が高頻度に観察され、細胞内に侵入した菌の大部分がオートファジー分解を受けるため、オートファジーの分子メカニズム研究に最適なモデルであると考えられる (Ogawa *et al.*, 2009, Nakagawa *et al.*, 2004a)。本研究においては新規 NLR の一つである NLRX1 とオートファジーの関連について分子化学的手法を用いることで解析を試みた。

## 2-6 本研究の意義 ～細菌による感染症の制御を目指して～

病原細菌によって引き起こされる感染症は、世界中の多くの国々で重大な社会問題となっている。開発途上国では現在も古くからの伝染性疾患が流行し続け、先進国においても新興・再興感染症あるいは高齢化・高度医療にともなう日和見感染症の増加等、感染症に関連する多くの問題を抱えている。また、感染症は人々の社会活動や医療の現場においても大きな損失をもたらす原因となり、感染症の制圧は我々人類の課題の一つであると考えられる。

病原細菌の感染・発症の制御を目標とし、これまで多くの研究が行われてきた。しかしながら、これまでの細菌学においては細菌の病原性のみを対象とし、一方で免疫学においては宿主応答のみを対象としてきたことから、感染時に細菌側のどの因子がどのように作用し、宿主生体内でどのような分子の挙動が変化することによって発症に至っているのかを説明することは非常に困難であった。

近年になって、ようやく多くの研究グループが感染症について病原細菌と宿主と相

相互作用からその発症機構の解明を試みるようになった。その結果、いくつかの病原性細菌が宿主細胞のアクチン細胞骨格の再構築を誘導し、宿主細胞内に侵入あるいは定着すること (Ray *et al.*, 2009, Alonso *et al.*, 2004), あるいは、宿主細胞にアポトーシスやネクローシスを誘導することで積極的に免疫系を回避していることなどが明らかになってきた (Gao *et al.*, 2000).

感染症の発症の原因となる病原細菌と宿主の相互作用を分子レベルで明らかとするために、本研究においては、GAS の病原性発揮に最も重要な要素と考えられる宿主上皮細胞への侵入に着目し、細胞侵入によって誘導される細胞死とオートファジーについて、その誘導および制御機構の解明を試みた。これらの解析から得られた知見が、本菌による感染症の予防・治療へ積極的に応用されることが期待される。

### 第3章 GAS 感染上皮細胞における細胞死誘導機構の解析

当研究室ではこれまでに、フィブロネクチンを介した GAS の上皮細胞への侵入がミトコンドリアの機能異常を誘導し、結果として細胞死が起こることを明らかにしてきた (Nakagawa *et al.*, 2001, Nakagawa *et al.*, 2004b). また, GAS 感染による細胞死の誘導については, GAS の細胞内への侵入が必要である (Tsai *et al.*, 1999), あるいは SLO による膜貫通孔の形成が必要である (Cywes Bentley *et al.*, 2005), といった報告があるが, 現在までに GAS 感染による細胞死の詳細な誘導機構は明らかではない.

本研究では, GAS の上皮細胞感染に伴って誘導される細胞死について, 特に本菌の細胞侵入と ROS 産生に着目した. ROS は細胞死を制御するシグナル伝達経路において仲介役として存在するが (Thannickal *et al.*, 2000), ROS の分子ターゲットやその産生機構の詳細は現在までに解明されていない. 例えば, 好中球において, ROS はファゴソーム内の membrane oxidase によって産生され, エンドサイトーシスによって侵入してきた病原体の殺菌に利用される (Bokoch, 1995). 一方で, 非貪食細胞死においては, 上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) の活性化を介して形質膜上の異なる oxidase によって産生される (Bae *et al.*, 1997).

以上の背景を踏まえ, 本章では GAS の細胞侵入に伴う ROS 産生を解析し, 細胞死に関わる ROS の分子ターゲットの同定を行うとともに, ROS 産生とミトコンドリアの機能異常の関連を解析することで細胞死の詳細な誘導機構を明らかにすることを試みた.

#### 3-1 GAS の細胞侵入によって誘導される細胞死と Bcl-2 による抑制

GAS は細胞内に侵入することで, 細胞死を誘導すると考えられる. そこで, まず HeLa HBD98V-1 細胞 (コントロールベクターを恒常的に発現させた HeLa 細胞) と HeLa HBD98-2-4 細胞 (細胞死抑制因子 Bcl-2 を恒常的に発現させた HeLa 細胞) に侵入する GAS の数を定量した. 菌株は, GAS の基準株である JRS4 株 (M6 type GAS) と SAM1 株 [JRS4 株のフィブロネクチン結合タンパク質 F1 を欠失させた株 (Hanski *et al.*, 1992)] を感染させた. 両細胞において, JRS4 株の侵入数に違いは認められなかったが, SAM1 株の侵入数は 1% 以下であった (図 5A). また, Bcl-2 の発現は JRS4 株,

SAM1 株の細胞侵入に影響を与えなかった。

次に、JRS4 株あるいは SAM1 株を感染させた細胞を Annexin V と propidium iodine (PI)で染色し、フローサイトメーターによって細胞死の検出を行った (図 5B, C). 細胞死の誘導変化の 1 つとして、細胞膜リン脂質の非対称性の喪失がみられる。この際、通常は脂質 2 重層の内側に存在している負電荷をもった phosphatidylserine (PS)が外側に転移が起こり、Annexin V が  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で強力に PS に結合する。また、PI は細胞膜の破壊によって細胞内へと入り、DNA と結合することから、これらの 2 つの色素を用いた染色によって、初期細胞死と後期細胞死を区別することも可能となる。感染 3 時間において、JRS4 株を感染させた HeLa HBD98V-1 細胞において annexin V あるいは PI に陽性の細胞が観察された。このうち、annexin V 陽性・PI 陰性細胞 (初期細胞死細胞: annexin V<sup>+</sup> PI<sup>-</sup>)は 15.5%, annexin V<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> 細胞 (後期細胞死細胞)は 10.5%であった。annexin V 陽性細胞の数は JRS4 株感染後経時的に増加し、感染 5 時間目には 80%の細胞が陽性であった (図 5C)。一方で、Bcl-2 を発現させた HeLa HBD98-2-4 細胞においては、感染 5 時間目においても細胞死を示した細胞は 50%以下であった。SAM1 感染させた細胞においては、両細胞において細胞死は認められなかった (図 5C)。これらの結果から、GAS は細胞内に侵入することで細胞死を誘導し、この細胞死の誘導は Bcl-2 の強発現によって抑制されることが明らかになった。

### 3-2 GAS の細胞侵入による ROS 産生と細胞死の誘導

細胞死誘導の誘導において、ROS は種々のシグナルカスケードの調節因子であると考えられる。しかしながら、ROS がどのように上皮細胞への GAS 感染と関連するのか、あるいはどのようにミトコンドリアの機能異常を誘導するのかは明らかとされていない。これらの事象を検討するために、GAS 感染による ROS 産生の増加とミトコンドリアの膜電位の低下 ( $\Delta\Phi_m$ )を解析した。ROS 産生の増加は dihydroethidium (HE)によって定量した。この色素は ROS によって単量体色素 (ethidium)に変換される (HE → Eth)。またミトコンドリアの機能異常を 3,3' - Dihexyloxacarbocyanine iodide [DIOC<sub>6</sub>(3)]による染色によって膜電位の低下を定量することで解析した。感染 3 時間目において、JRS4 株を感染させた HeLa HBD98V-1 細胞では Eth 陽性・DIOC<sub>6</sub>(3)陽性細胞 (Eth<sup>high</sup> DIOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup> 細胞)が観察された (図 6A, B)。感染 5 時間目

には、これらの細胞死関連変化を示す細胞は 90%に達した。一方で、これら細胞死関連変化を示す細胞は、Bcl-2 を発現させた HeLa HBD98-2-4 細胞では感染 3 時間では 7%, 5 時間目では 34%に抑制された。細胞侵入能を欠いた SAM1 株の感染においては、両細胞においてこれらの細胞死関連変化は認められなかった (図 6B)。これまでに, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (mCICCP)あるいは Staurosporine で処理した細胞ではミトコンドリアの膜電位の低下が誘導されることが報告されており (Zamzami *et al.*, 1995), 本研究においても HeLa HBD98V-1 細胞をこれらの薬剤による処理によってミトコンドリアの膜電位の低下が観察されたが, ROS 産生の増加は認められなかった (7A, B)。さらに, mCICCP あるいは Staurosporine の処理によって誘導されたミトコンドリアの膜電位の低下は Bcl-2 強発現細胞において抑制された。

次に 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)による染色を行いミトコンドリアの膜電位の低下を示す細胞の定量を行った。JC-1 はミトコンドリアの膜電位が低下によって、単量体としてミトコンドリアに包含され, 527 nm で蛍光を発する特徴をもつ。一方で、ミトコンドリアの膜電位の上昇に伴い, JC-1 は凝集体 (J-aggregates)を形成して 590 nm で強い蛍光を発する。この性状を利用することで、ミトコンドリアの膜電位の低下を解析することが可能となる (膜電位低下: orange [590 nm] → green [527 nm])。表 3 で示すように、コントロール細胞の  $86.2 \pm 2.2\%$ が J-aggregates 陽性細胞であったが, Staurosporine で処理した細胞では  $31.1 \pm 3.3\%$ が J-aggregates 陽性細胞であった。JRS4 株を感染させた HeLa HBD98V-1 細胞においては, J-aggregates 陽性細胞は感染 1 時間目では  $52.5 \pm 3.4\%$ であり, 感染 3 時間目では  $1.8 \pm 0.4\%$ であった。HeLa HBD98-2-4 細胞においては, JRS4 株感染による J-aggregates 陽性細胞の減少は  $68.7 \pm 6.2\%$ に抑制された。また, SAM1 株の感染においては, 感染 3 時間目に J-aggregates 陽性細胞は  $78.7 \pm 4.2\%$ であった。これらの結果から GAS の細胞侵入によるミトコンドリアの膜電位の低下は Staurosporine で処理によって誘導される膜電位の低下より強力に誘導されることを示唆している。

さらに GAS 感染時の caspase-3 の活性化と poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の開裂を解析した。JRS4 株を感染させた HeLa HBD98V-1 細胞において, caspase-3 の活性化と PARP の開裂が認められた (図 8A, B)。しかしながら, HeLa HBD98-2-4 細胞

においては, caspase-3 の活性化は HBD98V-1 細胞への感染時と比較して 30%程度まで抑制され, PARP の開裂は観察されなかった (図 8A, B). また SAM1 株の感染によっては caspase-3 の活性化および PARP の開裂のどちらも観察されなかった. 損傷を受けたミトコンドリアから細胞質へのシトクローム c の放出は, caspase-9 依存的な細胞死シグナルの伝達に重要であることから, さらに GAS 感染時の caspase-9 の活性化についても解析を行った. JRS4 株を感染させた HeLa HBD98V-1 細胞においては, caspase-9 の活性化 (caspase-9 の開裂)が観察されたが, 一方で, HBD98-2-4 細胞においては caspase-9 の活性化は認められなかった (図 8C). 以上の結果から, GAS の細胞侵入は ROS 産生及びミトコンドリアの機能異常を誘導することで, 結果として細胞死を導くことが明らかとなった. また, GAS 感染によるミトコンドリアの機能異常は Bcl-2 の強発現によって抑制されることが明らかとなった.

### 3-3 GAS の細胞侵入による ROS 産生の増加とミトコンドリアの膜電位の低下

図 9A で示すように, ROS 細胞は GAS の感染量依存的に増加した. また, 感染 1 時間目において, moi:100 で JRS4 株を感染させた時には細胞の 40%が, moi:50 で感染させた時には細胞の 15%が, moi:10 で感染させた時には細胞の 9%がミトコンドリアの膜電位の低下を示した. さらに, ミトコンドリアの膜電位の低下を示す細胞の数は感染時間に依存して増加したが, それらの増加率は GAS の感染量に依存していた (図 9B).

GAS の細胞侵入が ROS 産生を誘導するの可否かを試験するために, cytochalasin D によって細胞のアクチンフィラメントの再重合を阻害し, GAS 侵入時に ROS 産生の増加とミトコンドリアの膜電位の低下が起こるのかを解析した (図 9C). GAS 感染によって誘導される Eth<sup>high</sup> DIOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup> 細胞は cytochalasin D の濃度依存的に阻害された. これらの結果から, ROS 産生およびミトコンドリアの膜電位の低下は GAS の細胞侵入によって誘導され, 細胞内に侵入する GAS の数に強く相関することが示唆された.



### 3-4 GAS の細胞侵入による small GTPase Rac1 の活性化

small GTPase Rac1 は ROS 産生の主要な調節因子であり、様々な細菌の細胞侵入に伴い活性化される。そこで、GAS の細胞侵入によって Rac1 が活性化されるのか否かを試験した。JRS4 株の感染によって cdc42/Rac1 のリン酸化が観察された。またリン酸化 Rac1 は GAS の感染時間に依存して増加した (図 10A)。一方で、SAM1 感染細胞では cdc42/Rac1 のリン酸化は検出されなかった。次に、内因性の Rac1 が GAS の侵入によって活性化しているのかを試験した (図 10B)。活性化 Rac1 は PAK に結合することから、PAK に結合させたアガロースビーズを GAS 感染細胞溶解液に加え、抗 Rac1 抗体によって免疫沈降させた。またコントロールとして、GTP を加えた細胞溶解液を使用した。JRS4 株の感染によって、PAK へ結合する Rac1-GTP のレベルは感染後 60-90 分でピークを示したが、SAM1 株の感染では PAK の結合は認められなかった。以上より、GAS の侵入によって Rac1 が活性化することが明らかになった。

### 3-5 Rac1 によるアクチンの再構築と GAS の細胞侵入

GAS 感染による ROS 産生の増加に Rac1 が関与するのか否かを評価するために、種々の Rac1 変異体を作製した。変異体は、点変異によって各々のエフェクター領域を欠失するように作製した。これらの変異体を HeLa HBD98V-1 細胞へ形質導入後、JRS4 株を感染させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GAS の細胞侵入部位を観察した。図 11A で示すように、野生型の Rac1 (Rac1 wt) と dominant active 変異体 (Rac1 V12) を形質導入した細胞においては、アクチンの再構築が起こっている部位 (green image) と GAS (red image) の共局在が認められた。特に、アクチンフィラメントは GAS の侵入部位にリクルートされていたことから (図 11B)、アクチンの再構築は GAS の細胞侵入において重要な役割を担っていることが示唆された。

また、細菌の生存とアクチン再構築の関連性を phalloidin 染色によって試験した (図 12, 13)。JRS4 株の生菌は細胞のアクチンフィラメントと共局在した (yellow 矢印) が、熱処理によって死菌となった JRS4 株は細胞への付着を示したものの、GAS の付着部位へのアクチンのリクルートは認められなかった。SAM1 感染細胞においては、GAS の付着部位へのアクチンのリクルートは認められたが、アクチン集積のレベルは JRS4 株と比較して顕著に減少していた (図 13)。細胞に付着した 40% の

JRS4 株生菌が phalloidin 陽性であったが, SAM1 株については細胞に付着した生菌のわずか 5-6%程度が phalloidin 陽性であった (図 14A). 加えて, JRS4 株の生菌だけが細胞死を誘導した (図 14B). 以上の結果から, GAS の細胞への付着ではなく侵入が Rac1 の活性化と細胞死の誘導に重要であることが示唆された.

### 3-6 Rac1 の L37 domain による ROS 産生の増加と細胞死誘導

Rac1 の細胞死への影響を評価するために, 種々の Rac1 の変異体を HeLa HBD98V-1 細胞に形質導入した. Rac1 wt と Rac1 L37 変異体 (Rac1 L37) の形質導入した細胞においては, 細胞内への GAS の侵入数に影響は認められなかったが, dominant active 変異体である Rac1 V12 あるいは Rac1 L61 を形質導入した細胞においては JRS4 株の侵入数はわずかに増加した. 一方で, Rac1 dominant negative 変異体 (Rac1 N17) を形質導入した細胞では, 細胞内に侵入する GAS は 30%以上も減少した (図 15A). これらの結果から, GAS の細胞侵入に Rac1 の活性化が重要であることが示唆された.

次に, これらの Rac1 変異体を形質導入した細胞において ROS 産生をミトコンドリアの膜電位の低下を試験した. Rac1 wt, V12, L61, V12L61 を形質導入した HeLa HBD98V-1 細胞では, JRS4 株の感染によって Eth<sup>high</sup> DIOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup> 細胞は細胞の増加が観察された (図 15B). Rac1 N17 を形質導入した細胞では, Eth<sup>high</sup> DIOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup> 細胞は 30%以上も減少した. 興味深いことに, Rac1 L37 あるいは L37V12 を形質導入した細胞においては, GAS の細胞侵入数に影響は認められなかったが (図 15A), Eth<sup>high</sup> DIOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup> 細胞は顕著に減少した. 以上より, GAS の細胞侵入に伴う ROS 産生は Rac1 を介して誘導され, とくに Rac1 L37 domain が ROS 産生の誘導に重要であることが示唆された.

### 3-7 ROS 阻害剤による細胞死の抑制

Rac1 を介した ROS 産生がミトコンドリアの機能異常を惹起することで細胞死を誘導するかは現在までに明らかとされていない. そこで, ROS 阻害剤である *N*-acetyl cysteine (NAC) あるいは pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) で細胞を処理し, GAS 感染による ROS 産生の増加が抑制されるか解析した. JRS4 株感染による ROS 産生の増

加は両阻害剤の処理によって有意に抑制された (図 16). 次にミトコンドリアの機能異常を試験したところ, JRS4 株の感染によって, 5 時間目には Eth<sup>high</sup> DIOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup> 細胞は 86%に達したが, 1 mM NAC での処理によって 8.6%まで, 400  $\mu$ M PDTC の処理によって 6.8%まで抑制された. 一方で, SAM1 株感染細胞ではこれらの細胞死関連変化は誘導されなかった (図 17A). NAC あるいは PDTC の処理は GAS 感染による細胞死を抑制した. 特に, 400  $\mu$ M PDTC 処理によってヒストンの放出は 5.6%まで抑制された (図 17B). 以上より, GAS 感染による Rac1 の活性化は ROS 産生の増加を誘導し, 最終的に細胞死を誘導することが明らかになった.

### 3-8 ROS による p38 MAPK の活性化と細胞死の誘導

c-jun N-terminal kinase (JNK)と p38 mitogen activate protein kinase (p38MAPK)は細胞死の重要な調節因子であり, ROS 産生によって活性化される. そこで GAS 感染によって誘導される ROS 産生の増加が JNK あるいは p38MAPK を活性化するのか検討した. JRS4 株を感染させた HeLa HBD98V-1 細胞において, p38MAPK の活性化が認められた. 一方で JNK の活性化は認められなかった (図 18A). SAM1 株の感染によっては p38MAPK 及び JNK の活性化は認められなかった. 次に, p38MAPK の活性化が ROS 産生の阻害によって抑制されているか解析した. p38MAPK の活性化は PDTC 処理した細胞において抑制されたが, NAC 処理した細胞では抑制されなかった (図 18B). さらに, p38MAPK の特異的阻害剤である SB203580 の処理によって, JRS4 株感染細胞における p38MAPK の活性化は SB203850 の濃度依存的に抑制され, 加えて感染時間に依存して細胞死も抑制された (図 18C, 19A). 一方で, JNK の特異的阻害剤である SP600125 によって処理した細胞では, 細胞死の抑制は観察されなかった (図 19B). これらの結果から, GAS 感染による ROS 産生の増加は p38MAPK の活性化を誘導することで細胞死を誘導していることが明らかになった.

## 考察

本研究において、GAS の細胞への付着ではなく、侵入が細胞死を誘導することを明らかとした。また、GAS 感染によって誘導される細胞死は細胞死抑制因子である Bcl-2 によって抑制されることを明らかとした。同じグラム陽性細菌である *Staphylococcus aureus* は上皮細胞内への侵入によって TNF- $\alpha$  あるいは FAS を活性化させることで、caspase の活性化を誘導し、最終的に細胞死を引き起こすことが報告されている (Baran *et al.*, 2001, Haslinger *et al.*, 2003)。近年 GAS 感染においては、Cytolysin-mediated translocation (CMT) の関与が報告されている (Madden *et al.*, 2001)。この機構なかで、GAS は streptolysin O (SLO) を分泌することで宿主細胞に間孔を形成し、この間孔から *S. pyogenes* NAD-glycohydrolase (SPN) と呼ばれるエフェクター分子を宿主細胞の細胞質へと注入する (Madden *et al.*, 2001, Meehl *et al.*, 2004)。現在までに細胞死と CMT の関連は現在のところは不明であるが、単一の毒素の有無により説明できず、GAS 感染による細胞死は GAS の上皮細胞への侵入によって誘導されていることが示唆された。

GAS 感染による細胞死の誘導においてはミトコンドリアが重要な役割を担っていた。ミトコンドリアは膜電位の低下、ROS 産生の誘導だけでなく、permeability transition (PT) pore と呼ばれる間孔からシトクローム c などの細胞死関連因子を細胞質中へと放出することで、細胞死の誘導を起こす (Tsujimoto *et al.*, 2000, Zamzami *et al.*, 2001, Rajalingam *et al.*, 2007)。当研究室ではこれまでに、GAS が上皮細胞へ侵入することが宿主細胞の細胞死の誘導に効率的かつ必須であり、これはミトコンドリアからのシトクローム c の放出に起因していることを報告している (Nakagawa *et al.*, 2001, Nakagawa *et al.*, 2004b)。そこで本研究においては、GAS 感染に応答するミトコンドリアの変化を詳細に検討した。本研究は、ミトコンドリアが細胞内のフリーラジカルの重要な発生源であるという仮説を基に行われた (Teshima *et al.*, 1998)。本研究において、GAS の上皮細胞の侵入はミトコンドリアの膜電位の低下と ROS 産生を誘導すること、これらの変化が最終的に細胞死を誘導することを明らかとした。ミトコンドリアの膜電位の低下は mCICCP あるいは staurosporine の処理によって誘導されたが、これらの薬剤による処理によって ROS 産生の誘導は認められなかった。そのことから、GAS 感染による細胞死の誘導は、ミトコンドリアの機能異常と ROS

産生の両方が影響していると結論づけた。Calvino-Fernandez らは, *Helicobacter pylori* の感染によるミトコンドリアの膜電位の低下と ROS 産生の増加が, 感染上皮細胞の細胞死を誘導することを報告している (Calvino-Fernandez *et al.*, 2008). 本研究では, GAS 感染による ROS 産生の増加とミトコンドリアの膜電位の低下は細胞死抑制因子である Bcl-2 の強発現によって抑制された。さらに, caspase-3/9 の活性化及び PARP の開裂も Bcl-2 の強発現細胞においては顕著に抑制された。以上の結果より, GAS の細胞侵入による ROS 産生の増加とミトコンドリアの機能異常は上皮細胞の細胞死を効果的に促進していると考えられた。

Rac1 は small GTPase の Rho ファミリーの一員で, アクチン再構築, 細胞構造変化, DNA 合成の誘導, ROS 産生, 軸索誘導, 細胞の移動等, 様々な細胞変化に関わることが報告されている (Bosco *et al.*, 2009). Nerlich らは, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3Ks)ではなく, Src kinase 及び Rac1 の活性化が GAS の細胞侵入に必要であることを報告しているが (Nerlich *et al.*, 2009), Rac1 の活性化と ROS 産生の関連については明らかとされていなかった。本研究において, Rac1 が効率的に GAS を細胞内へと侵入させること, また ROS 産生を増加させることを発見した。これまでに, 貪食細胞において Rac1 は NADPH oxidase を活性化することで ROS 産生を誘導し, 細胞内に侵入した病原体を殺菌することが報告されている (Bokoch, 1995). しかしながら, GAS 感染に対して Rac1 が ROS 産生の増加に関わるのか, あるいは細胞死の誘導に関わるのかはこれまで不明であった。本研究では GAS 感染細胞において経時的に Rac1 の活性化がおこること, 活性型 Rac1 の PAK の結合が感染 60-90 分の間にピークを迎えることを発見した。これに関連して, Cywes らは GAS 莢膜のヒアルロン酸と CD44 の相互作用が Rac1 依存的な細胞間ジャンクションの破壊と細胞膜ラフリングを誘導することで, GAS を効率的に細胞内へと侵入させることを報告している (Cywes Bentley *et al.*, 2005). 本研究においては, Rac1 は細胞のフィブロネクチンに GAS のフィブロネクチン結合タンパク質 (FnBPs)が結合することで活性化され, 効率的に GAS を細胞内に侵入させていることが明らかとなった。

Rac1 野生型あるいは活性型変異体である Rac1 V12 を形質導入した細胞においては, GAS 侵入部位へのアクチンのリクルートが観察されたが, 一方で, 不活性型変異体である Rac1 N17 を形質導入した細胞においてはアクチンのリクルートは有意

に抑制され、細胞内へ侵入する GAS の数も抑制された。これらの結果から、Rac1 によるアクチンの再構築は上皮細胞への GAS の侵入にとって重要であることが示唆された。Joneson と Bar-Sagi の報告によると、Rac1 の NADPH oxidase へ結合する L37 位 (effector-binding loop domain)の変異体 (Rac1 L37)は、NADPH oxidase の活性化による ROS 産生を抑制することを報告している (Joneson *et al.*, 1998)。また、*Vibrio vulnificus* 感染による Rac1 の活性化は、ROS 産生の増加を誘導することで、最終的に貪食細胞の細胞死を引き起こすことが報告されている (Kim *et al.*, 2008)。今回の結果から、Rac1 L37 を形質導入した細胞では GAS の細胞侵入には影響は認められなかったが、ROS 産生は有意に抑制された。以上の結果より、NADPH oxidase 活性化による ROS 産生は、GAS の細胞侵入による Rac1 の活性化によって誘導されることが明らかとなった。また、GAS の細胞侵入によるアクチン再構築及び細胞死の誘導は GAS の生菌の感染時にのみ起こることから、Rac1 の活性化には GAS の細胞内への侵入が重要であり、この Rac1 の活性化によって ROS 産生を誘導することで細胞死を引き起こすことが明らかとなった。

構造的な違いはあるが、NAC 及び PDTC はラジカル阻害剤であり、ROS 代謝を変化させることで種々の細胞において抗酸化作用を発揮する (Meyer *et al.*, 1993, Zafarullah *et al.*, 2003)。NAC 及び PDTC による NF- $\kappa$ B の活性化阻害は、上皮細胞の細胞死の誘導を抑制することが報告されている (Aoki *et al.*, 2001, Zafarullah *et al.*, 2003)。また、PDTC については、細胞死の誘導に関与する電離放射線及び TNF 刺激による ROS 産生を抑制することが報告されている (Schreck *et al.*, 1992, Garg *et al.*, 2002)。さらに、NAC は PDTC と比較して 3 倍もの抗酸化活性を示すことも示されている (Zhu *et al.*, 2002)。本研究においては、GAS 感染による ROS 産生、ミトコンドリアの膜電位の低下、及び細胞死の誘導は NAC あるいは PDTC の処理により有意に抑制された。以上の結果から、GAS の感染した上皮細胞においては、Rac1 の活性化により ROS 産生が誘導され、これがミトコンドリアの機能異常と細胞死を引き起こすことが明らかとなった。

p38MAPK が GAS 感染による ROS 産生を介して活性化されることを見出した。これまでに、ROS 産生に依存して活性化される apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask-1)-p38MAPK 経路が、Toll-like receptor (TLR)-4 によって惹起される免疫応答に

重要な役割を担っていることが報告されている (Matsuzawa *et al.*, 2005). またこれまでに当研究室では, GAS 感染細胞について実施した転写解析から Ask-1 の活性化が GAS 感染によって増加することを報告している (Nakagawa *et al.*, 2004a). 以上のことから, GAS 感染による細胞死の誘導には, Ask-p38MAPK 経路の活性化の関与が示唆された. また, p38MAPK の活性化は ROS 阻害剤である PDTC によって阻害され, 加えて p38MAPK の特異的阻害剤である SB203580 での処理によって細胞死も抑制されたことから, p38MAPK の活性化は ROS 産生に依存して起こり, GAS 感染による細胞死はこの p38MAPK の活性化に依存して誘導されることが示唆された.

以上の結果から, small GTPase Rac1 は宿主細胞のフィブロネクチンと GAS の FnBP が複合体を形成する中で活性化し, GAS の細胞侵入部位にアクチンをリクルートすることで効率的に GAS を細胞内へと侵入させていると考えられた. 活性化した Rac1 は NADPH oxidase に結合することで ROS 産生を誘導し, これにより caspase の活性化などのミトコンドリアの機能異常を誘導すると共に p38MAPK を活性化し, 最終的に宿主細胞に細胞死が引き起こされることが明らかとなった (図 20).

## 第4章 新規 Nod-like receptor NLRX1 によるオートファジー制御機構の解析

GAS は上皮細胞に付着し、エンドサイトーシスにより細胞内へ侵入するが、脂質二重層の膜貫通作用を持つ SLO によりエンドソーム膜を破壊し、エンドソーム-リソソーム系による分解から逃れる。しかし、細胞内へ侵入した GAS は、細胞のタンパク質分解システムであるオートファジーにより、速やかに分解、除去される (Nakagawa *et al.*, 2004a) (図 21)。しかしながら、NLRs による GAS の認識機構やオートファジーの制御機構についての詳細は現在までに明らかではない。

本研究においては新たに報告された新規 NLR である NLRX1 に着目し、GAS 感染によって誘導されるオートファジーの制御機構の解明を試みた。NLRX1 は NLRs 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 (Moore *et al.*, 2008, Arnoult *et al.*, 2009) (図 22)。NLRX1 は Mitochondrial antiviral signalling adaptor (MAVS) と相互作用し、ウイルス RNA による I 型インターフェロン反応を抑制することから、RIG-I like receptor (RLR) シグナルの負のレギュレーターであると示唆されている (Moore *et al.*, 2008)。また、NLRX1 を強発現させた細胞においては、Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  による刺激、あるいは *Shigella flexneri* の感染によって、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) や (JNK) が活性化されることが報告されている (Tattoli *et al.*, 2008)。さらに、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 ROS の産生を促進することが報告されている (Arnoult *et al.*, 2009)。しかしながら、NLRX1 が細胞内へ侵入した GAS をどのように認識しているのか、あるいはオートファジー誘導に関連しているのかは現在まで明らかではない。

以上より、本章では、GAS 感染上皮細胞における NLRX1 とオートファジーの関連について分子生物学的手法による解析を試みた。

### 4-1 GAS 感染細胞における NLRX1 によるオートファジーの誘導促進

細胞内に侵入した病原体に対して、宿主細胞はオートファジーを誘導することでこれらを分解・排除する。オートファジーの誘導には細胞内の病原体を認識する Nod-like receptors (NLRs) が重要な役割を担っていると考えられる。そこで、本研究



では、GAS 感染に対して誘導されるオートファジーの制御機構に、近年発見された NLRs の 1 つである NLRX1 が関連するのか解析を行った。オートファジーの誘導は、オートファジーの膜構造体 (隔離膜, オートファゴソームおよびオートリソソーム) のマーカータンパク質である LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を融合した EGFP-LC3 を HeLa 細胞に発現させ、GAS 感染後に細胞質内の菌を囲う LC3 vacuoles (以下 GAS-containing LC3 vacuoles (GcLVs) と呼ぶ) の形成率を共焦点レーザー顕微鏡によって観察することで評価した (図 23A, B)。Control vector を導入した HeLa 細胞においては、GcLVs の形成率は GAS 感染 1 時間後に  $8.2 \pm 1.0\%$ 、2 時間後に  $10.5 \pm 0.11\%$ 、3 時間後に約  $15.7 \pm 1.2\%$ 、そして 4 時間目には  $20.8 \pm 0.83\%$  となり経時的に増加した。一方で、NLRX-1 を強発現した HeLa 細胞(HeLa NLRX1-FLAG)においては、Control vector を強発現させた細胞と比較して、GcLVs の形成は感染の早い段階で起き、感染後 1 時間目には 10% を超え、感染 2 時間目には約 15% にまで達した。また、NLRX1 をノックダウンした細胞 (HeLa miR-NLRX1) において、感染 2 時間目以降の GcLVs の形成は顕著に減少した (図 23B)。

LC3 は酵母 Autophagy-related genes 8 (Atg8) の哺乳類ホモログで、オートファゴソームのマーカーとして利用される。LC3 は合成された直後に Atg4 によって切断され LC3-I となり、さらにオートファジーが誘導されると、LC3-I の C 末端グリシンにホスファチジルエタノールアミンが共有結合して LC3-II となる。LC3-II は膜結合型であることから、その多くはオートファゴソーム膜に存在すると考えられる。NLRX1 強発現細胞では GcLVs の形成が促進されたことから、NLRX1 強発現細胞においては LC3-I から LC3-II の変換が GAS 感染後の早い段階に起きていると考えられた。抗 LC3 抗体を用いた Western blotting 法による解析から、NLRX1 強発現細胞においては、LC3-II への変換が GAS 感染 1 時間目から認められ、感染 2-3 時間の間にピークとなった (図 24)。一方で、Control vector を導入した細胞では、LC3 の活性化は GAS 感染後 3-4 時間の間でピークとなった。また、オートファゴソームはリソソームと結合し、オートリソソームとなり病原体を分解することから、NLRX1 強発現細胞におけるオートリソソームの形成を観察した。NLRX1 強発現細胞においては、リソソームマーカーである lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1) と共局在する

GcLVs の数は, Control vector を導入した細胞よりも顕著に増加した (図 25A, B). GcLVs 及びオートリソソームの増加が観察されたことから, 次に細胞の GAS の生存率を測定した (図 26). NLRX1 強発現細胞においては, 細胞内の GAS 生存率は顕著に減少した. これらの結果から, NLRX1 の強発現によって LC3 の活性化が促進され, オートファゴソームが増加することが明らかとなった. また, NLRX1 強発現細胞においてはオートファゴソームとリソソームの融合が GAS 感染の早い段階から起きることで, GAS 細胞内の効率的に分解されていることが明らかとなった.

#### 4-2 NLRX1 による ROS 産生の増加と NF- $\kappa$ B のダウンレギュレーション

NLRX1 強発現細胞において GAS 感染によるオートファジーが促進される機構の解明を試みた. まず種々の Atg タンパク質と NLRX1 が直接相互作用するのかを試験した. 図 27 で示すように, 免疫沈降法を用いた解析から NLRX1 と結合する Atg タンパク質は観察されなかった. つまり, NLRX1 は Atg タンパク質とは直接相互作用することとなく, 別の機構によってオートファジーを促進していると考えられた.

次に, NLRX1 強発現細胞において, GAS 感染による nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), serum response element (SRE), cAMP-response element (CRE) あるいは activating protein-1 (AP-1) の活性化をプロモーターアッセイによって解析した (図 28). GAS 感染によって, SRE, CRE, AP-1 がわずかに活性化したが, Control vector を導入した HeLa 細胞と NLRX1 を強発現させた細胞間で有意な差は認められなかった. 一方で, Control vector を導入した細胞では GAS 感染後経時的に NF- $\kappa$ B の活性化が増加したのに対して, NLRX1 強発現細胞では NF- $\kappa$ B の活性化は認められなかった. また, 共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察においても, Control vector を導入した細胞では, プロモーターアッセイで活性の見られた感染 150 分後に NF- $\kappa$ B の核移行が認められた. 一方で, NLRX1 強発現細胞においては NF- $\kappa$ B の核移行はほとんど認められなかった (図 29). NF- $\kappa$ B とオートファジーの関連については, これまでに NF- $\kappa$ B の活性化抑制によって, TNF- $\alpha$  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とから (Djavaheri-Mergny *et al.*, 2006), NLRX1 による NF- $\kappa$ B の活性化の抑制によって GAS 感染に対する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.

これまでに ROS 産生の増加によって, LC3 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ことから (Huang *et al.*, 2009b), 次に NLRX1 強発現細胞における ROS 産生の増加を試験した. Control vector を導入した HeLa 細胞においても, GAS 感染によって ROS 産生が認められたが, NLRX1 強発現細胞においては ROS 産生のさらなる増強が観察された (図 30). GAS 感染によって small GTPase Rac1 を介した NADPH oxidase の活性化が起こり, これにより ROS 産生が誘導される事は前章において既に述べた. また 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, ミトコンドリアからの ROS の産生を促進することが報告されている (Arnoult *et al.*, 2009). 以上の点を踏まえて, GAS 感染に対するオートファジーの誘導には ROS 産生が重要な役割をしていると仮定した. この仮定を証明するために, NLRX1 を強発現した細胞を種々の ROS 阻害剤で処理した後 GAS を感染させ, GcLVs の形成を観察した (図 31). NADPH oxidase 阻害薬の diphenyliodonium (DPI) あるいは  $\alpha$ -tocopherol の処理によって, Control vector 及び NLRX1 を導入した細胞では GcLVs の形成率は顕著に減少した. 興味深いことに, ミトコンドリア I 複合体阻害剤である Rotenone での処理によって, NLRX1 強発現細胞における GcLVs の形成率は有意に抑制され, Control vector 導入細胞の GcLVs 形成率を大きく下回った. さらに, Rac1 のノックダウンによって, Control vector を導入した細胞と NLRX1 を強発現させた細胞の両方で GcLVs 形成の減少が認められた (図 32). しかしながら, NLRX1 強発現細胞での GcLVs の減少は Control vector 強発現細胞での GcLVs の減少よりも緩やかであった. これらの結果から, GAS 感染に対するオートファジーの誘導には ROS 産生が重要な役割を担っており, 特に NLRX1 はミトコンドリアからの ROS 産生を増加させることで効率的に LC3 をオートファゴソーム膜へとリクルートしオートファジーを促進していることが示唆された.

#### 4-3 NLRX1 NACHT domain を介したオートファジーの促進

オートファジーの促進に必要な NLRX1 のエフェクタードメインを決定するために, NLRX1 のドメイン欠損体の作製を行った. 本研究においては, N terminal domain ( $\Delta$ Nter), NACHT domain ( $\Delta$ NACHT), LRR domain ( $\Delta$ LRR) 及び NACHT と LRR の間のドメイン ( $\Delta$ mid) の欠損体をそれぞれ作製した (図 33). 共焦点レーザー顕微鏡に用

いて NLRX1  $\Delta$ NACHT,  $\Delta$ LRR,  $\Delta$ mid の細胞内局在を観察したところ、これらの欠損体はミトコンドリアマーカである MitoTracker と共局在し、全長を保持した NLRX1 (NLRX1-wt) の細胞内局在との間に違いは認められなかった。一方で、NLRX1  $\Delta$ Nter は細胞質中に散在していたことから、これまでの報告にもあった通り (Tattoli *et al.*, 2008), NLRX1 がミトコンドリアに局在するためには N terminal domain が重要であることが確認された。それぞれの変異体を形質導入した HeLa 細胞に GAS を感染させ、GcLVs の形成率を試験したところ、 $\Delta$ Nter,  $\Delta$ LRR 及び  $\Delta$ mid を形質導入した細胞においては、Control vector を形質導入した細胞と比較して GcLVs の形成が増加したが、NLRX1-wt を形質導入した細胞の形成率との間に有意な差は認められなかった (図 34)。一方で、 $\Delta$ NACHT を形質導入した細胞においては、GcLVs の形成率は Control vector を形質導入した細胞と同程度であった。また、 $\Delta$ NACHT を形質導入した細胞では、GAS 感染による ROS 産生のレベルも NLRX1-wt を形質導入した細胞と同程度であった (図 35)。これらの結果から、NLRX1 は自身の NACHT domain を介してミトコンドリアからの ROS 産生を増加させることで GAS 感染に対するオートファジーを促進していると考えられた。

#### 4-4 NLRX1 NACHT domain と TNIP1 の直接相互作用による NF- $\kappa$ B の活性化とオートファジーの促進

NLRX1 の強発現細胞では NF- $\kappa$ B の活性化が抑制された (図 28, 29)。これまでに NF- $\kappa$ B の活性化抑制によって、TNF- $\alpha$  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が (Djavaheri-Mergny *et al.*, 2006), GAS 感染に対する NLRX1 を介した NF- $\kappa$ B の活性化の抑制機構ならびにオートファジー促進機構については現在までに明らかとされていない。そこで、NLRX1 の NACHT domain と直接相互作用する分子を酵母 two hybrid system によって探索したところ、NF- $\kappa$ B の負の制御因子として TNIP1 (別名 ABIN1: A20 binding inhibitor of NF- $\kappa$ B activation-1) を同定することに成功した (図 36)。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察においては、TNIP1 は細胞質中に散在し、NLRX1 とは共局在は認められなかったが (図 36B)、免疫沈降法では NLRX1 と直接結合することが確認された (図 36A)。TNIP1 は Ubiquitin-editing NF- $\kappa$ B inhibitor protein A20 (別名 TNFAIP3: TNF- $\alpha$  induced protein 3) と結合し、

NEMO/ IKK- $\gamma$  における A20 を介したポリユビキチン鎖の除去を促進することで, IKK 複合体 (IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , NEMO/IKK- $\gamma$  の 3 つからなる) のキナーゼ活性を阻害し, NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する (Verstrepen *et al.*, 2009) (図 37A). IKK- $\alpha$  が細胞質全体に散在していることから, TNIP1 と IKK- $\alpha$  の共局在を認めることができなかったが (図 37B), TNIP1 のノックダウンによって, NLRX1 強発現細胞においても NF- $\kappa$ B の活性化が回復し (図 38A), NF- $\kappa$ B の核移行も観察された (図 38C). 最後に, TNIP-1 をノックダウンした HeLa 細胞に GAS を感染させ, GcLVs の形成率を観察したところ, Control vector を導入した細胞に比べて GcLVs の形成率は顕著に低下した (図 39). 以上の結果から, GAS 感染時に NLRX1 の NACHT domain は TNIP1 と直接相互作用することで, NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することでオートファジーの促進に関与することが示唆された.

## 考察

オートファジーは細胞内に侵入した細菌に対する自然免疫として注目されている。オートファジーは、宿主細胞内に存在する菌体成分認識分子によって誘導されると考えられる。例えば *Drosophila melanogaster* 由来の細胞においては、*Listeria monocytogenes* 感染後、菌体細胞壁の成分であるペプチドグリカン認識分子 (peptidoglycan-sensing molecules) がオートファジーを誘導することが報告されている (Yano *et al.*, 2008)。加えて、ジアミンピメリン酸型のペプチドグリカンの認識分子である PGRP-LE は、*D. melanogaster* の細胞において *L. monocytogenes* の感染に対するオートファジーの誘導に関わっていることが報告されている (Kaneko *et al.*, 2006, Zaidman-Remy *et al.*, 2006)。さらに、当研究室でのこれまでの研究から、GAS 感染に対するオートファジーの誘導には NLRs のメンバーである NLRP4 と NLRP10 による菌体認識が重要であることが明らかとなっている (data not shown)。本研究においては、近年発見された NLRs の一員である NLRX1 が GAS 感染に対するオートファジーの誘導を促進することを明らかとした。

NLRX1 強発現細胞においては、GcLVs の形成が促進され、リソソームとの融合も GAS 感染の早い段階で誘導された。またこれに伴い GAS の細胞内生存率は顕著に減少した。以上の結果から NLRX1 は GAS 感染に対するオートファジーの誘導を促進していることが明らかとなった。これまでに、NLRs とオートファジーの関連については、グラム陽性菌を認識する細胞内レセプターである Nod1 が *L. monocytogenes* 感染に対して、またグラム陰性菌を認識する細胞内レセプターである Nod2 が *Shigella flexneri* 感染に対して応答し、菌の細胞侵入部位へ Atg タンパク質の 1 つである Atg16L1 を効率的にリクルートすることでオートファジーを制御していることが報告されている (Travassos *et al.*, 2010)。本試験においては、NLRX1 と Atg16 を含めた Atg タンパク質との直接的な相互作用は認められなかったことから、Atg16 の関与は不明であるが、NLRX1 は GAS 感染に対して効率的にオートファジーを誘導していることが示唆された。

NLRX1 強発現細胞では ROS 産生の増加が認められた。これまでに、生理的条件下 (飢餓時) のオートファジーの誘導に ROS 産生が重要であること (Scherz-Shouval *et al.*, 2007)、また、ROS 産生の増加によって、LC3 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 (Huang *et al.*, 2009b). さらに, 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 ROS の産生を促進することが報告されている (Arnoult *et al.*, 2009). 本研究においては, 種々の ROS 阻害剤処理によって, GAS を感染させた NLRX1 強発現細胞において, オートファジーの誘導は顕著に抑制された. GAS 感染によって Rac1 を介した NADPAH oxidase の活性化が ROS 産生を増加させることは前章で述べたが, NADPH oxidase 阻害剤である DPI あるいは  $\alpha$ -tocopherol で処理した細胞においてはオートファジーが抑制され, 加えて Rac1 のノックダウンによっても GAS 感染に対するオートファジーの誘導が抑制された. これらの結果から, membrane oxidase 由来の ROS 産生がオートファジーの誘導に重要な役割を担っていることが示唆された. また, ミトコンドリア I 複合体阻害剤である Rotenone での処理によって, Control vector を導入した細胞及び NLRX1 強発現細胞においてオートファジーの誘導抑制が抑制されたことから, GAS 感染によるオートファジーの誘導には NADPH oxidase からだけでなく, ミトコンドリアからの ROS 産生も関与していることが示唆された. さらに, Rotenone 処理した NLRX1 強発現細胞においては, Control vector 導入細胞と比較して, オートファジーの抑制がより明確に観察されたことから, NLRX1 の強発現によってミトコンドリアからの ROS 産生が増加し, これに伴ってオートファジーが効率的に誘導されていることが示唆された. 本研究の結果から, GAS 感染に対するオートファジーの促進に関わる NLRX1 のドメインは NACHT domain であること, また, ミトコンドリアからの ROS 産生増加に関わる NLRX1 のエフェクタードメインも NACHT domain であることが明らかとなった. 一方でこれまでに, ミトコンドリアからの ROS 産生には NLRX1 の N terminal region が重要であることも報告されており (Arnoult *et al.*, 2009), NLRX1 と ROS 産生の関連についてはさらなる解析が必要であると考えられる.

NF- $\kappa$ B は, 細菌感染に対する種々のシグナル伝達において最も重要な調節因子の 1 つである. NF- $\kappa$ B を介したシグナル伝達は, 炎症応答の誘導, 安定化だけでなく細胞の増殖あるいは生存においても重要である (Bonizzi *et al.*, 2004). NF- $\kappa$ B とオートファジーの関連については, これまでに NF- $\kappa$ B の活性化抑制によって, TNF- $\alpha$  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 (Verstrepen *et al.*,

2009). また, *Escherichia coli* を感染させたマクロファージにおいては, NF- $\kappa$ B の抑制によって *E. coli* に対す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 (Schlottmann *et al.*, 2008). NLRX1 強発現細胞においては NF- $\kappa$ B の活性が抑制された. ここで, GAS 感染に対するオートファジーの促進には NLRX1 の NACHT domain が必要であったことから, NACHT domain と直接相互作用し, かつ NF- $\kappa$ B の抑制に関わる分子を探索し, 結果として TNIP1 を同定することに成功した. TNIP1 は A20 と結合し, NEMO/ IKK- $\gamma$  における A20 を介したポリユビキチン鎖の除去を促進することで, TNF やその他の刺激による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが報告されている (Verstrepen *et al.*, 2009). さらに, これまでに ROS 産生の増加によって Atg6 のほ乳類細胞内でのホモログである Beclin1 が活性化しオートファジーの誘導が促進されること, そしてこの ROS 産生の増加は NF- $\kappa$ B の活性化に伴い抑制されることが報告されている (Djavaheri-Mergny *et al.*, 2007). 本研究においても, NLRX1 強発現時に抑制されていた NF- $\kappa$ B の活性は TNIP1 のノックダウンによって回復し, GAS に対するオートファジーの誘導は顕著に抑制された. NLRX1 と TNIP1 の相互作用による NF- $\kappa$ B の抑制に関する詳細な機構, 及び NF- $\kappa$ B の抑制と ROS 産生の増加に関する詳細な機構は現在のところ不明であるが, NLRX1 と TNIP1 の相互作用を介した NF- $\kappa$ B の抑制はオートファジーの効率的な誘導に重要であることが示唆された.

これまでの結果から, NLRX1 は NACHT domain を介してミトコンドリアからの ROS 産生を増加させることが明らかとなった. さらに NACHT domain は TNIP1 と直接相互作用することで NF- $\kappa$ B の活性を抑制することが明らかとなった (図 40). 宿主細胞はこれらの細胞内変化によってオートファジーを効率的に誘導することで, GAS の感染拡大を阻止していると考えられる.



## 第5章 総括

細胞内へ侵入を果たした細菌と宿主細胞の間には様々な攻防が繰り広げられている。GAS は細胞死を誘導することで上皮細胞から脱出し、より深部組織での定着を図ると考えられる。一方で、宿主細胞はオートファジーを誘導することで GAS を効率的に分解・排除しようとする。本研究では、GAS の上皮細胞への侵入によって活性化した Rac1 が、NADPH oxidase を活性化させることで ROS 産生を誘導することを明らかにした。さらに、細胞内の ROS 産生の増加は、ミトコンドリアの機能異常の引き起こし、また同時に p38MAPK が活性化することで、最終的に細胞死が誘導することを明らかにした。オートファジーについては、NLRs の一員である NLRX1 が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 と直接相互作用することで、NF- $\kappa$ B の活性を抑制しオートファジーを促進していることを明らかにした。特に、GAS 感染による細胞死とオートファジーの制御の両方で、細胞内の ROS 産生が重要な役割を担っている事は注目すべき事実である。

しかしながら、細胞死の誘導によって細胞外へと脱出した本菌が深部組織でどのようにして定着を果たすのか、そしてこれらの GAS に対して宿主細胞がどのような対抗するのかは分かっていない。オートファジーについても、NLRs の一員である NLRX1 がその誘導に関連することを明らかにしたが、細胞内に侵入した GAS を NLRX1 がどのように認識しオートファジーを誘導するのかは不明である。このことから、GAS 感染と宿主の応答の相互作用のついては包括的なさらなる解析が必要であると考えられる。

最後に、本研究で得られた知見は GAS と宿主との間に存在する様々な攻防の中の一つを明らかにしたに過ぎないが、今後の解析によって得られる研究結果と合わせて、広く理解され、GAS による感染症の制御を目指して臨床応用に転化されることを期待する。

## 材料と実験方法

### 細菌と細胞

Group A streptococcus は JRS4 株と SAM1 株 (JRS4 株のフィブロネクチン結合タンパク質を欠失させた株)を用い, 0.2% Yeast extract を含む 3% Todd-Hewitt 培地 (THY) で培養した. 細胞にはヒト子宮頸部癌細胞である HeLa 細胞のうち, 野生型細胞(HeLa), Bcl-2 を恒常的に発現させた HeLa HBD98-2-4 細胞, control vector を恒常的に発現させた HeLa HBD98V-1 細胞の 3 種類を用いた. これの細胞を Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 10% fetal calf serum (FCS) および 50  $\mu\text{g/ml}$  ゲンタマイシンを加えた培地で培養した. FCS は 56°C で 30 分間非働化後に使用した.

### GAS 感染実験

一晚培養した菌株を新しい THY 培地に 1/100 量加えて培養した. また, 前日に播種した培養細胞の培地 (ゲンタマイシン終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$ ) は, 感染の 3 時間前にゲンタマイシンを含まない培地に置換した. 菌は培養液の  $\text{OD}_{600}$  が 0.6 (mid-log phase  $4 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ ) まで培養した. 死細胞の感染に際しては, 得られた菌液を 65°C で加熱することで死菌体を得た. 培養菌液を遠心し, 得られた沈殿をゲンタマイシンを含まない細胞用培地に懸濁し, 細胞に感染させた. 感染細胞は  $\text{CO}_2$  インキュベーター ( $\text{CO}_2$  5%, 37 °C) で培養した. 感染開始から 1 時間後に培地を除き, ゲンタマイシンを終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  含む培地に置換し, 感染していない菌を除去した. 細胞の回収の際にリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS; pH7.4) で 2 回ずつ洗浄した.

### 抗体

cleaved PARP, cleaved caspase-9, MAPK (p38MAPK, JNK)に対する抗体は Cell Signaling Technology より購入し, ブロッキング液に対して 1:1000 で Western blotting に使用した. Rac1, 活性型 Rac1 (p-Rac1), GST 融合型 PAK-PBD に対する抗体は Transduction laboratories (BD Biosciences)より購入し, ブロッキング液に対して 1:1000 で Western blotting に使用した. 抗 HA 抗体 (Cell Signaling Technology) はブ

ロッキング液に対して 1:400 で蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察に使用した。抗 Cy-5 抗体 (Jackson Immuno Research) はブロッキング液に対して 1:200 で共焦点レーザー顕微鏡による観察に使用した。抗 GAL4 (DBD) 抗体 (Santa cruz) はブロッキング液 (3% スキムミルク, 2.5% donkey serum, 2.5% goat serum, 0.05% NaN<sub>3</sub> を含む PBS) に対して 1:1000 で Western blotting に使用した。抗 FLAG 抗体 (Sigma) はブロッキング液に対して 1:1000 で Western blotting に使用した。抗 GFP 抗体 (MBL) はブロッキング液に対して 1:1000 で Western blotting に使用した。抗 TNIP1 抗体 (Cell Signaling Technology) はブロッキング液に対して 1:1000 で Western blotting に使用した。抗 LC3 抗体 (MBL) はブロッキング液に対して 1:100 で抗体染色に使用した。抗 NF- $\kappa$ B 抗体 (Cell Signaling Technology) はブロッキング液に対して 1:50 で抗体染色に使用した。抗 Ikk- $\alpha$  抗体 (Santa cruz) はブロッキング液に対して 1:50 で抗体染色に使用した。二次抗体である Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 抗マウス, 抗ラビット, 抗ラット抗体 (Jackson Immuno Research) はブロッキング液に対して 1:5000 で Western blotting に使用した。

### 細胞内の細菌の経時的な生存率計測

$2 \times 10^4$  個/穴になるように、HeLa 細胞を播種し、24 時間後、目的のプラスミドをトランスフェクトした。培地は感染 3 時間前に抗生物質を含まない培地 400  $\mu$ l に置換した。トランスフェクトから 48 時間後に、1:100 [multiplicity of infection (MOI): 100] になるように細胞培養液で調整した菌液 100  $\mu$ l を接種した。なお、菌液は PBS で一度洗浄した後、細胞用培地に懸濁後、接種した。感染から 1 時間後、PBS で細胞を洗浄した後、2 時間目以降に回収する細胞は 100  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンと 100 U/ml ペニシリン G を含む培地に置換した。細胞の回収にあたっては、まず PBS で細胞を洗浄した後、滅菌水を 500  $\mu$ l 加え、5 分間インキュベートした。インキュベート後、ピペティングで細胞を剥がし 1.5 ml チューブに回収し、再度滅菌水 500  $\mu$ l で残った細胞を回収した。全量を 1 ml とした細胞懸濁液は、ボルテックスによって残存した細胞を破碎し、続いて PBS で適宜希釈して THY 培地に塗抹し、翌日出現したコロニーの数を計測した。1 時間目の菌数に対する 2 時間目の菌数の割合を菌の侵入率とし、2 時間目の菌数に対するその後の時間帯の菌数の割合を菌の生存率とした。実験

は  $n = 3$  で行った.

## 細胞死の評価

細胞死の検出にはフローサイトメトリー (FACS)解析あるいは enzyme-linked immunosorbent (ELISA)法を用いた. FACS 解析には BD Bioscience 社の FACScan あるいは FACSANTO II を用いた. ELISA 法は Roche Diagnosis 社の Cell Death Detection ELISA kit を用いた. フローサイトメーターによる解析の 10 分前に, 感染細胞は propidium iodine (PI, Sigma, 1  $\mu$ g/ml) と AlexaFluor488-conjugated annexin V (Molecular Probes, 500 U/ml)で染色した. ELISA 法による細胞死の検出に際しては,  $1 \times 10^5$  個の非感染細胞を高張液 (10 mM Tris pH 7.4, 400 mM NaCl, 5mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ )で溶解した時の遊離ヒストン量を 100%とした時の, 感染細胞の遊離ヒストン量の相対値を算出した. caspase-3/-7 の活性化は, 特異的合成基質である Ac-Asp-Glu-Thy-Asp-MCA (DEVD)の分解を蛍光リーダー (BioRad)を用いて測定した. 蛍光強度は, コントロールである 7-amino-4-methylcoumarin (AMC)によって描かれた標準曲線を基に算出した. PARP の分解と caspase-9 の活性化はそれぞれに特異的な cleaved-PARP, cleaved-caspase-9 抗体を用いて western blotting により検出した. p38MAPK 特異的阻害剤である SB203580 は WAKO Pure Chemicals より購入した. また, JNK 特異的阻害剤である SP600125 は Nacalai Tesque より購入した.

## ミトコンドリア膜電位の低下 ( $\Delta\Phi_m$ )と ROS 産生の測定

$5 \times 10^5$  の細胞に MOI: 100 を基準として GAS を感染させた. 各感染時間で回収された細胞に 40 nM 3,3' - Dihexyloxacarbocyanine iodide (DIOC<sub>6</sub>(3))と 2  $\mu$ M HE (ともに Molecular probes)を加え 37°C 15 分間インキュベートし染色した後, フローサイトメーターによって解析した. 陽性コントロールとして, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (mCICCP, 50  $\mu$ M Sigma)あるいは Staurosporine (1  $\mu$ M Sant Cruz)によって 2 時間処理した細胞を使用した. ミトコンドリア膜電位の低下の測定についてはさらに, JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)色素 を使用した染色により定量化した. 各感染時間に回収した細胞に 1 mg/ml JC-1 を加え 15 分間染色した. ROS 阻害剤であ

る NAC (1 mM), PDTC (400  $\mu$ M) (ともに sigma-Aldrich)は感染 1 時間前に, diphenyliodonium (DPI: ALEXIS Biochemicals),  $\alpha$ -tocopherol (Sigma)あるいは Rotenone (Nacalai tesque)は感染 30 分前に細胞培養液に加えた.

### Rac1 発現ベクター及び Rac1 変異体の作製

ヒト Rac1 cDNA は, Rac1-F: 5'-GATCGGATCCATGCAGGCCATCAAGTGTGT-3' 及び Rac1-R: 5'-GATCGAATTCTTACAACAGCAGCATTTTC-3'のプライマーペアを用いて, ヒト PBMC cDNA ライブラリーから PCR によって増幅した. 下線は Bam HI および EcoR I サイトを示した. PCR 産物は Bam HI および EcoR I による制限処理後, pcDNA3.1Zeo(+)ベクター (Invitrogen)にライゲートした. このベクターの Hind III と Bam HI サイトの間に triple HA epitope Tag (3 $\times$ YPYDVPDYA)に相当する合成ヌクレオチドを挿入したものの発現 Rac1 ベクターとして使用した. Rac1 変異体の作製は, MutanK Express kit (Takara Shuzo, Japan)によって点変異を導入することにより作製した. Rac1 の dominant active 変異体 (Rac1 V12 及び Rac1 L61) は GTGGGAGACGTAGCTGTAGGTAAA による点変異の導入によって構築した.

### 発現プラスミド (Gateway)

目的のタンパク質を Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP) もしくは mCherry, FLAG 等のタグタンパク質が融合した形で発現させるため, Invitrogen の Gateway システムによりプラスミドの構築を行った. 詳細は以下の通りである. 目的タンパク質の遺伝子を PCR で増幅後, プラスミド pENTR/D-TOPO (Invitrogen) に BP 反応により組み込み, これをエントリークローンとした. 次に, LR 反応によりエントリークローンから部位特異的な組み換え反応により目的の遺伝子を pcDNA6.2/N-EmGFP-DEST (Invitrogen) に移入し, これを発現クローンとした. この発現クローンを細胞にトランスフェクトすることで, EmGFP 融合タンパク質を発現させた. 同様にして, LR 反応によりエントリークローンの目的遺伝子を pcDNA6.2/N-mCherry-DEST に移入することで mCherry 融合タンパク質を, p3 $\times$ FLAG-N-DEST に移入することで FLAG 融合タンパク質を発現させるためのプラスミドを作製した.

特定のタンパク質をノックダウンするため、Invitrogen の miRNA ベクターによる miR-RNA RNAi システムを用いた。miR-RNAi オリゴは Invitrogen のウェブサイト上で設計した。オリゴは両鎖をアニーリング後、pcDNA6.2-GW/miR (Invitrogen) ヘライゲーションした。ノックダウンの効果は、Western blotting により確認した。設計したオリゴ配列は表 1 の通りである。

## トランスフェクション

作製した各プラスミドを HeLa 細胞にポリエチレンイミンを用いたリポフェクション法により遺伝子導入した (Boussif *et al.*, 1995)。HeLa 細胞を 24 穴プレートに播種し、培養 24 時間後に細胞ウェルを抗生物質の含まれていない 5% FCS DMEM に置換した。プラスミド 0.4  $\mu$ g, Opti-MEM (Invitrogen) 100  $\mu$ l, 2 mg/ml polyethylenimine 2  $\mu$ l を混合し、室温で 15 分間インキュベートして作製した DNA 混合液を細胞に添加し、4 時間インキュベートした後、抗生物質を含んだ新しい培地に置換した。

## レポーターアッセイ

ルシフェラーゼアッセイは Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて実施した。本研究においては、Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), serum response element (SRE), cAMP-response element (CRE) あるいは activating protein-1 (AP-1) のプロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*)を組み込んだプラスミドを用いた。これらのプラスミドを形質導入した  $1 \times 10^5$  個の HeLa 細胞に MOI:100 で GAS を感染させ、経時的に Passive lysis buffer で溶解後回収した。回収した細胞溶解液中のホタルルシフェラーゼ遺伝子の活性を蛍光強度として測定した。ホタルルシフェラーゼの活性化は、ウミシイタケルシフェラーゼ (phRL-TK-derived *Renilla reniformis* luciferase) の活性を指標に標準化した。Luciferase Assay Reagent II (LAR II) を添加して“グロータイプ”の発光シグナルを発生させ、ホタルルシフェラーゼレポーターを測定した。ホタルルシフェラーゼによる発光を測定した後、同じチューブに Stop & Glo Reagent を添加してこの反応を消光させると同時に、ウミシイタケルシフェラーゼ反応を開始した。ウミシイタケルシフェラーゼ反応によって、Stop & Glo Reagent も測定時間中にゆっくりと減衰する“グロータイプ”のシグナル

の発生を測定した.

### Western blotting

SDS-PAGE にて分離したタンパク質を PVDF 膜 (PALL Corporation) に転写後, ブロッキング溶液 (5% スキムミルクを含む Tris 緩衝生理食塩水 [TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl]) で, 室温 1 時間ブロッキングした後, 一次抗体を含んだブロッキング溶液において室温 1 時間反応させた. 0.05% Tween 20 を含む TBS (TBS-T) で洗浄後, 二次抗体 (HRP-conjugated antibodies) を含んだブロッキング溶液において室温 1 時間反応させた. TBS-T で洗浄後, ECL plus Western Blotting Reagent (GE Healthcare) を加えて反応させ, Chemidoc (BioRad) で検出した.

### 免疫沈降法

FLAG 融合タンパク質と EmGFP 融合タンパク質を発現させた HeLa 細胞の細胞溶解液 500  $\mu$ l に抗 FLAG 抗体 0.5  $\mu$ l を加え, 4°C で 1 時間攪拌した. Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 0.5% NP40 (IGEPAL CA-630), protease inhibitor (Nacalai), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で洗浄後, Lysis buffer で洗浄及び懸濁した Protein G Sepharose (GE Healthcare) 20  $\mu$ l を加え, 4°C で 2 時間攪拌した. Protein G Sepharose は, Lysis buffer で洗浄後, 何もトランスフェクトしていない細胞溶解液と 4°C で 1 時間攪拌後, さらに Lysis buffer によって洗浄し前処理した. サンプルは Protein G Sepharose と反応後, Lysis buffer で 5 回以上洗浄し, 等量の 2 $\times$ sample buffer [0.5M Tris-HCl : pH 6.8, 10% SDS, glycerol, 1.2% 2-mercaptoethanol, Bromo Phenol Blue (BPB)]を加え, 100°C 5 分間ボイルした. その後, 上清を SDS-PAGE にて展開し, Western blotting により抗 GFP 抗体で相互作用するタンパク質のバンドを検出した.

### 共焦点レーザー顕微鏡による解析

24 穴プレートに直径 12 mm のカバーガラスを入れ, 0.5% gelatin を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 1 ml 加え, 室温で 15 分間ガラスをコートした. その後, ガラス上に HeLa 細胞を  $2 \times 10^4$  個/well になるように播種した. 播種から 24 時間後に各プラスミドをトランスフェクトし, さらにその 48 時間後に菌を感染させた. 細胞

は感染 3 時間前に抗生物質を含まない培地に置換した。菌は mid-log phase のものを集菌後, PBS で洗浄し, 細胞に対して MOI: 100 になるように細胞培養液で調整後感染させた。2 時間目以降に回収する細胞は 100  $\mu\text{g/ml}$  ゲンタマイシンと 100 U/ml ペニシリン G を含む培地に置換した。各時間帯で回収したガラス上の細胞は, 4% paraformaldehyde を含む PBS で 30 分間固定した。PBS で洗浄後, 0.1% TritonX-100 を含む PBS において室温で 10 分間静置し, PBS で洗浄後, ブロッキング液 (3% スキムミルク, 2.5% donkey serum, 2.5% goat serum, 0.05%  $\text{NaN}_3$  を含む PBS) において室温 1 時間ブロッキングした。その後, 各種一次抗体を含んだブロッキング液において室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後, 二次抗体を含んだブロッキング液において室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後, 0.2  $\mu\text{g/ml}$  propidium iodide (PI, Sigma) または 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Nacalai) を含んだブロッキング液において, 室温で 40 分間反応させた。PBS で洗浄後, カバーガラスをスライドガラス上に VECTASHIELD (Vector laboratories) で封入し, 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV1000) を用いて解析した。

### GcLVs 形成率測定

各条件で作製した細胞サンプルを, 共焦点レーザー顕微鏡下で観察し, 細胞内に菌の侵入が認められた細胞の内, 菌を囲んだ LC3 vacuoles (GcLVs) が認められた細胞の割合を計測した。各条件で最低 500 細胞の計測を行った。実験は  $n = 3$  で行った。

### 酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニング

NLRX1 の NACHT ドメインの cDNA を pGBKT7 (Clontech) に組み込んだものを, 酢酸リチウム法にて *Saccharomyces cerevisiae* HF7c へ遺伝子導入した。この HF7c 株を mid-log phase まで培養し, ペレットにしたものに, pACT2-human lymphocyte MATCHMAKER cDNA library (Clontech) を酢酸リチウム法で遺伝子導入し, ロイシン (Leu), トリプトファン (Trp), ヒスチジン (His) 非添加の栄養要求性選択培地に塗抹し, 30°C で 3 日間培養した。各ドメインに対して  $1 \times 10^7$  クローン以上のスクリーニングを行い, 栄養要求性選択培地に生えた全てのコロニーに対して  $\beta$ -galactosidase assay を行った。 $\beta$ -galactosidase assay において陽性となったクローン



について、その cDNA 配列を決定し、human GenBank にて BLAST 類似検索を行った。また同時に、陽性クローンから得られた prey プラスミドを、bait を保持した酵母に再遺伝子導入し、栄養要求性選択、 $\beta$ -galactosidase assay を行った。BLAST 類似検索の結果得られた候補タンパク質の遺伝子はクローニング後、pACT2 に組み込み、栄養要求性選択、 $\beta$ -galactosidase assay を行った。

## 統計処理

エラーバーは各 n 数で行った実験の標準偏差を表した。有意性は Student の t 検定により評価した。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御懇意なる御指導下さいました先生方に心から謝意を表します。

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 細菌感染制御学 教授 中川一路

東京大学大学院 医科学研究所 疾患蛋白質工学分野 教授 津本浩平

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 細菌感染制御学 准教授 丸山史人

そして、たくさんの御援助と御協力を頂いた東京医科歯科大学医歯学総合研究科細菌感染制御学分野の皆様に、厚く御礼申し上げます。

最後に、これまでの研究生活を支え、温かく見守って頂きました、両親、姉そして彼女に感謝致します。

## 参考文献

- Abdissa, A., Asrat, D., Kronvall, G., Shittu, B., Achiko, D., Zeidan, M., Yamuah, L.K. and Aseffa, A. (2006). High diversity of group A streptococcal emm types among healthy schoolchildren in Ethiopia. *Clin Infect Dis* **42**, 1362-1367.
- Alonso, A. and Garcia-del Portillo, F. (2004). Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* **7**, 181-191.
- Amer, A.O. and Swanson, M.S. (2005). Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **7**, 765-778.
- Aoki, M., Nata, T., Morishita, R., Matsushita, H., Nakagami, H., Yamamoto, K., Yamazaki, K., Nakabayashi, M., Ogihara, T. and Kaneda, Y. (2001). Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension* **38**, 48-55.
- Arnoult, D., Soares, F., Tattoli, I., Castanier, C., Philpott, D.J. and Girardin, S.E. (2009). An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J Cell Sci* **122**, 3161-3168.
- Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B. and Rhee, S.G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 217-221.
- Baran, J., Weglarczyk, K., Mysiak, M., Guzik, K., Ernst, M., Flad, H.D. and Pryjma, J. (2001). Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**, 1287-1297.
- Beres, S.B. and Musser, J.M. (2007). Contribution of exogenous genetic elements to the group A Streptococcus metagenome. *PLoS One* **2**, e800.
- Beres, S.B., Sesso, R., Pinto, S.W., Hoe, N.P., Porcella, S.F., Deleo, F.R. and Musser, J.M. (2008). Genome sequence of a Lancefield group C Streptococcus zooepidemicus strain causing epidemic nephritis: new information about an old disease. *PLoS One*

**3**, e3026.

- Birmingham, C.L., Canadien, V., Kaniuk, N.A., Steinberg, B.E., Higgins, D.E. and Brumell, J.H. (2008). Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature* **451**, 350-354.
- Birmingham, C.L., Smith, A.C., Bakowski, M.A., Yoshimori, T. and Brumell, J.H. (2006). Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J Biol Chem* **281**, 11374-11383.
- Bisno, A.L., Brito, M.O. and Collins, C.M. (2003). Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* **3**, 191-200.
- Bokoch, G.M. (1995). Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol* **5**, 109-113.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280-288.
- Bosco, E.E., Mulloy, J.C. and Zheng, Y. (2009). Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cell Mol Life Sci* **66**, 370-374.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301.
- Brenot, A., King, K.Y. and Caparon, M.G. (2005). The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **55**, 221-234.
- Calvino-Fernandez, M., Benito-Martinez, S. and Parra-Cid, T. (2008). Oxidative stress by *Helicobacter pylori* causes apoptosis through mitochondrial pathway in gastric epithelial cells. *Apoptosis* **13**, 1267-1280.
- Cossart, P. and Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* **10**, 1041-1050.
- Cue, D., Southern, S.O., Southern, P.J., Prabhakar, J., Lorelli, W., Smallheer, J.M., Mousa, S.A. and Cleary, P.P. (2000). A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin alpha 5beta 1-fibronectin-M1 protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**,

2858-2863.

- Cue, D.R. and Cleary, P.P. (1997). High-frequency invasion of epithelial cells by *Streptococcus pyogenes* can be activated by fibrinogen and peptides containing the sequence RGD. *Infect Immun* **65**, 2759-2764.
- Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* **14**, 70-77.
- Cunningham, M.W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13**, 470-511.
- Cywes Bentley, C., Hakansson, A., Christianson, J. and Wessels, M.R. (2005). Extracellular group A Streptococcus induces keratinocyte apoptosis by dysregulating calcium signalling. *Cell Microbiol* **7**, 945-955.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. and Traganos, F. (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27**, 1-20.
- Delbridge, L.M. and O'Riordan, M.X. (2007). Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol* **19**, 10-16.
- Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Mathieu, J., Besancon, F., Bauvy, C. and Codogno, P. (2007). Regulation of autophagy by NFkappaB transcription factor and reactive oxygen species. *Autophagy* **3**, 390-392.
- Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Mathieu, J., Besancon, F., Bauvy, C., Souquere, S., Pierron, G. and Codogno, P. (2006). NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* **281**, 30373-30382.
- Fiorentino, L., Stehlik, C., Oliveira, V., Ariza, M.E., Godzik, A. and Reed, J.C. (2002). A novel PAAD-containing protein that modulates NF-kappa B induction by cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *J Biol Chem* **277**, 35333-35340.
- Gao, L.Y. and Kwai, Y.A. (2000). The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* **8**, 306-313.
- Garg, A.K. and Aggarwal, B.B. (2002). Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol* **39**, 509-517.
- Goebel, W. and Kuhn, M. (2000). Bacterial replication in the host cell cytosol. *Curr Opin*

*Microbiol* **3**, 49-53.

- Gryllos, I., Grifantini, R., Colaprico, A., Cary, M.E., Hakansson, A., Carey, D.W., Suarez-Chavez, M., Kalish, L.A., Mitchell, P.D., White, G.L. and Wessels, M.R. (2008). PerR confers phagocytic killing resistance and allows pharyngeal colonization by group A Streptococcus. *PLoS Pathog* **4**, e1000145.
- Gurusamy, N. and Das, D.K. (2009). Is autophagy a double-edged sword for the heart? *Acta Physiol Hung* **96**, 267-276.
- Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**, 311-330.
- Hanski, E. and Caparon, M. (1992). Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6172-6176.
- Haslinger, B., Strangfeld, K., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. and Sinha, B. (2003). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol* **5**, 729-741.
- Hersh, D., Monack, D.M., Smith, M.R., Ghorri, N., Falkow, S. and Zychlinsky, A. (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2396-2401.
- Hiemstra, P.S., van den Barselaar, M.T., Roest, M., Nibbering, P.H. and van Furth, R. (1999). Ubiquitin, a novel murine microbicidal protein present in the cytosolic fraction of macrophages. *J Leukoc Biol* **66**, 423-428.
- Hilbi, H., Moss, J.E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., Flavell, R.A., Yuan, J., Sansonetti, P.J. and Zychlinsky, A. (1998). *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* **273**, 32895-32900.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241-251.
- Huang, J. and Brumell, J.H. (2009a). Autophagy in immunity against intracellular bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **335**, 189-215.
- Huang, J., Canadien, V., Lam, G.Y., Steinberg, B.E., Dinauer, M.C., Magalhaes, M.A.,

- Glogauer, M., Grinstein, S. and Brumell, J.H. (2009b). Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6226-6231.
- Iimura, T., Kashiwagi, Y., Endo, M. and Amano, Y. (2006). Prevalence and persistence of certain serologic types of *Streptococcus pyogenes* in metropolitan Tokyo. *J Infect Chemother* **12**, 53-62.
- Joneson, T. and Bar-Sagi, D. (1998). A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *J Biol Chem* **273**, 17991-17994.
- Kahn, F., Morgelin, M., Shannon, O., Norrby-Teglund, A., Herwald, H., Olin, A.I. and Bjorck, L. (2008). Antibodies against a surface protein of *Streptococcus pyogenes* promote a pathological inflammatory response. *PLoS Pathog* **4**, e1000149.
- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.H., Ueda, K., Oshima, Y., Peach, C., Erturk-Hasdemir, D., Goldman, W.E., Oh, B.H., Kurata, S. and Silverman, N. (2006). PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat Immunol* **7**, 715-723.
- Kim, S.G., Kim, S.T., Kang, S.Y., Wang, Y., Kim, W. and Kang, K.Y. (2008). Proteomic analysis of reactive oxygen species (ROS)-related proteins in rice roots. *Plant Cell Rep* **27**, 363-375.
- Kimura, S., Noda, T. and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* **33**, 109-122.
- Kufer, T.A. and Sansonetti, P.J. (2007). Sensing of bacteria: NOD a lonely job. *Curr Opin Microbiol* **10**, 62-69.
- Levine, B. and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-477.
- Madden, J.C., Ruiz, N. and Caparon, M. (2001). Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell* **104**, 143-152.
- Manji, G.A., Wang, L., Geddes, B.J., Brown, M., Merriam, S., Al-Garawi, A., Mak, S.,

- Lora, J.M., Briskin, M., Jurman, M., Cao, J., DiStefano, P.S. and Bertin, J. (2002). PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* **277**, 11570-11575.
- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. and Ichijo, H. (2005). ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6**, 587-592.
- McShan, W.M., Ferretti, J.J., Karasawa, T., Suvorov, A.N., Lin, S., Qin, B., Jia, H., Kenton, S., Najar, F., Wu, H., Scott, J., Roe, B.A. and Savic, D.J. (2008). Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **190**, 7773-7785.
- Meehl, M.A. and Caparon, M.G. (2004). Specificity of streptolysin O in cytolysin-mediated translocation. *Mol Microbiol* **52**, 1665-1676.
- Meyer, M., Schreck, R. and Baeuerle, P.A. (1993). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* **12**, 2005-2015.
- Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E. and Falkow, S. (1996). *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9833-9838.
- Moore, C.B., Bergstralh, D.T., Duncan, J.A., Lei, Y., Morrison, T.E., Zimmermann, A.G., Accavitti-Loper, M.A., Madden, V.J., Sun, L., Ye, Z., Lich, J.D., Heise, M.T., Chen, Z. and Ting, J.P. (2008). NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* **451**, 573-577.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S. and Yoshimori, T. (2004a). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* **306**, 1037-1040.
- Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S. and Hamada, S. (2001). Cytochrome c-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial



- cells. *Cell Microbiol* **3**, 395-405.
- Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S. and Hamada, S. (2004b). Transcriptome analysis and gene expression profiles of early apoptosis-related genes in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell Microbiol* **6**, 939-952.
- Nerlich, A., Rohde, M., Talay, S.R., Genth, H., Just, I. and Chhatwal, G.S. (2009). Invasion of endothelial cells by tissue-invasive M3 type group A streptococci requires Src kinase and activation of Rac1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* **284**, 20319-20328.
- Noda, T., Suzuki, K. and Ohsumi, Y. (2002). Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol* **12**, 231-235.
- Ogawa, M., Nakagawa, I., Yoshikawa, Y., Hain, T., Chakraborty, T. and Sasakawa, C. (2009). *Streptococcus*-, *Shigella*-, and *Listeria*-induced autophagy. *Methods Enzymol* **452**, 363-381.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. and Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* **307**, 727-731.
- Py, B.F., Lipinski, M.M. and Yuan, J. (2007). Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* **3**, 117-125.
- Rajalingam, K., Oswald, M., Gottschalk, K. and Rudel, T. (2007). Smac/DIABLO is required for effector caspase activation during apoptosis in human cells. *Apoptosis* **12**, 1503-1510.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P.J. and Tang, C.M. (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 333-340.
- Reith, W. and Mach, B. (2001). The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol* **19**, 331-373.
- Rodrigues, P.H., Belanger, M., Dunn, W., Jr. and Progulske-Fox, A. (2008). *Porphyromonas gingivalis* and the autophagic pathway: an innate immune interaction? *Front Biosci* **13**, 178-187.
- Romano, P.S., Gutierrez, M.G., Beron, W., Rabinovitch, M. and Colombo, M.I. (2007). The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently

- replicate in the host cell. *Cell Microbiol* **9**, 891-909.
- Saitoh, T. and Akira, S. (2010). Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol* **189**, 925-935.
- Sanderson-Smith, M.L., Dinkla, K., Cole, J.N., Cork, A.J., Maamary, P.G., McArthur, J.D., Chhatwal, G.S. and Walker, M.J. (2008). M protein-mediated plasminogen binding is essential for the virulence of an invasive *Streptococcus pyogenes* isolate. *FASEB J* **22**, 2715-2722.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **26**, 1749-1760.
- Schlottmann, S., Buback, F., Stahl, B., Meierhenrich, R., Walter, P., Georgieff, M. and Senftleben, U. (2008). Prolonged classical NF-kappaB activation prevents autophagy upon E. coli stimulation in vitro: a potential resolving mechanism of inflammation. *Mediators Inflamm* **2008**, 725854.
- Schreck, R., Grassmann, R., Fleckenstein, B. and Baeuerle, P.A. (1992). Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *J Virol* **66**, 6288-6293.
- Shaw, P.J., Lamkanfi, M. and Kanneganti, T.D. (2010). NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur J Immunol* **40**, 624-627.
- Shimizu, S., Shinohara, Y. and Tsujimoto, Y. (2000). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* **19**, 4309-4318.
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A. and Deretic, V. (2006). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**, 1438-1441.
- Stevens, D.L. (2000). Streptococcal toxic shock syndrome associated with necrotizing fasciitis. *Annu Rev Med* **51**, 271-288.
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**, 189-200.
- Sumby, P., Barbian, K.D., Gardner, D.J., Whitney, A.R., Welty, D.M., Long, R.D., Bailey,

- J.R., Parnell, M.J., Hoe, N.P., Adams, G.G., Deleo, F.R. and Musser, J.M. (2005). Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1679-1684.
- Tattoli, I., Carneiro, L.A., Jehanno, M., Magalhaes, J.G., Shu, Y., Philpott, D.J., Arnoult, D. and Girardin, S.E. (2008). NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep* **9**, 293-300.
- Terao, Y., Kawabata, S., Nakata, M., Nakagawa, I. and Hamada, S. (2002). Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from toxic shock-like syndrome patients. *J Biol Chem* **277**, 47428-47435.
- Terao, Y., Yamaguchi, M., Hamada, S. and Kawabata, S. (2006). Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J Biol Chem* **281**, 14215-14223.
- Teshima, S., Rokutan, K., Nikawa, T. and Kishi, K. (1998). Guinea pig gastric mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system. *Gastroenterology* **115**, 1186-1196.
- Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1005-1028.
- Timmer, A.M., Timmer, J.C., Pence, M.A., Hsu, L.C., Ghochani, M., Frey, T.G., Karin, M., Salvesen, G.S. and Nizet, V. (2009). Streptolysin O promotes group A *Streptococcus* immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J Biol Chem* **284**, 862-871.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.G., Magalhaes, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I.G., Allaoui, A., Jones, N.L., Nunez, G., Girardin, S.E. and Philpott, D.J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* **11**, 55-62.

- Tsai, P.J., Lin, Y.S., Kuo, C.F., Lei, H.Y. and Wu, J.J. (1999). Group A Streptococcus induces apoptosis in human epithelial cells. *Infect Immun* **67**, 4334-4339.
- Tschopp, J., Martinon, F. and Burns, K. (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 95-104.
- Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466**, 6-10.
- Vergne, I., Singh, S., Roberts, E., Kyei, G., Master, S., Harris, J., de Haro, S., Naylor, J., Davis, A., Delgado, M. and Deretic, V. (2006). Autophagy in immune defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Autophagy* **2**, 175-178.
- Verstrepen, L., Carpentier, I., Verhelst, K. and Beyaert, R. (2009). ABINs: A20 binding inhibitors of NF-kappa B and apoptosis signaling. *Biochem Pharmacol* **78**, 105-114.
- Virtaneva, K., Porcella, S.F., Graham, M.R., Ireland, R.M., Johnson, C.A., Ricklefs, S.M., Babar, I., Parkins, L.D., Romero, R.A., Corn, G.J., Gardner, D.J., Bailey, J.R., Parnell, M.J. and Musser, J.M. (2005). Longitudinal analysis of the group A Streptococcus transcriptome in experimental pharyngitis in cynomolgus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9014-9019.
- Yano, T., Mita, S., Ohmori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R., Takada, H., Goldman, W.E., Fukase, K., Silverman, N., Yoshimori, T. and Kurata, S. (2008). Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol* **9**, 908-916.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., Kakizuka, A., Sztul, E., Chakraborty, T. and Sasakawa, C. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* **11**, 1233-1240.
- Yoshimori, T. and Noda, T. (2008). Toward unraveling membrane biogenesis in mammalian autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 401-407.
- Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J. and Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* **60**, 6-20.
- Zaidman-Remy, A., Herve, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.S., Blanot, D., Oh,

- B.H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D. and Lemaitre, B. (2006). The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* **24**, 463-473.
- Zamzami, N. and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 67-71.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B. and Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* **182**, 367-377.
- Zhu, B.Z., Carr, A.C. and Frei, B. (2002). Pyrrolidine dithiocarbamate is a potent antioxidant against hypochlorous acid-induced protein damage. *FEBS Lett* **532**, 80-84.
- Zinkernagel, A.S., Timmer, A.M., Pence, M.A., Locke, J.B., Buchanan, J.T., Turner, C.E., Mishalian, I., Sriskandan, S., Hanski, E. and Nizet, V. (2008). The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A *Streptococcus* promotes resistance to neutrophil killing. *Cell Host Microbe* **4**, 170-178.

**表1 miR-RNAi システムによるタンパク質ノックダウンに用いたオリゴDNA配列**

標的タンパク質名		配列
NLRX1	Top	5'-TGCTGTTGAGTTGCAAGCCCAGCTTCGTTTTGG CC ACTGACTGACGAAGCTGGTTGCAACTCAA-3'
	Bottom	5'-CCTGTTGAGTTGCAACCAGCTTCGTCAGTCAGT GGCCAAAACGAAGCTGGGCTTGCAACTCAAC-3'
Rac1	Top	5'-TGCTGTTGTGTAAGTATGATCAGTAGGCGTTTTGG CCACTGACTGACGCCTACTGCAGTTACACAA-3'
	Bottom	5'-CCTGTTGTGTAAGTATGATCAGTAGGCGTCAGTCAGT GGCCAAAACGCCTACTGATCAGTTACACAAC-3'
TNIP1	Top	5'-TGCTGTTCAAATTCAGAGGAGGTGCCGTTTTGG CCACTGACTGACGGCACCTCCTGAATTTGAA-3'
	Bottom	5'-CCTGTTCAAATTCAGAGGAGGTGCCGTCAGTCAGT GGCCAAAACGGCACCTCCTCTGAATTTGAAC-3'

表2 代表的なNLRPファミリー遺伝子のヒト生体内で高い発現を示す組織

名前	発現の高い組織	文献
CIITA	リンパ球, 単球, 樹状細胞	Reith W and Mach B, 2001
NLRP3	単球	
NLRP4	脾臓	Fiorentino L <i>et al</i> , 2002
NLRP12	マクロファージ, 好酸球	Manji GA <i>et al</i> , 2002
NOD1	心臓, 脾臓, 骨格筋, 卵巣	
NOD2	単球	
NLRX1	リンパ管, 扁桃腺	

\* 文献からの情報がない遺伝子についてはNCBIの遺伝子プロファイリング (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>)を用いて発現の高い組織を検索した.

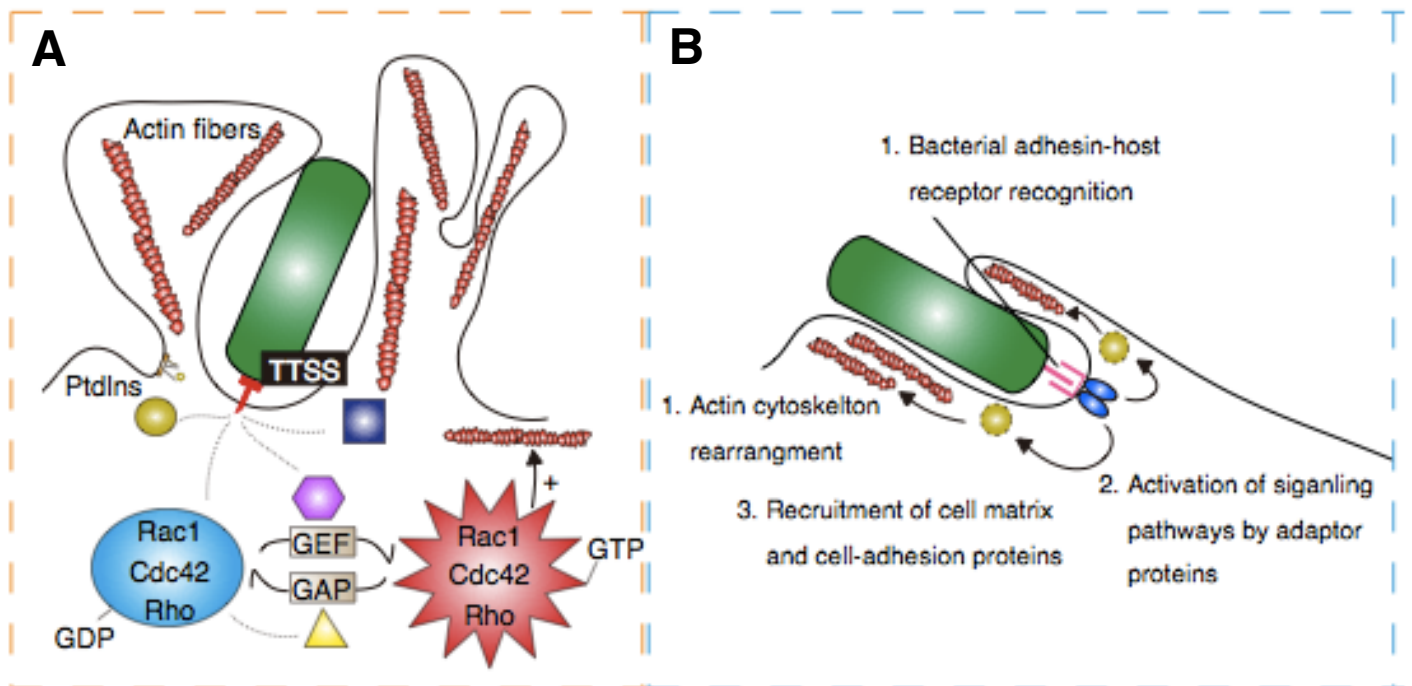


図1 細菌の細胞侵入と細胞内生存機構 (Box参照)

(A) Trigger mechanismによる細菌の細胞侵入. 本図には細菌のIII型分泌機構 (TTSS)から細胞内へと移行したエフェクターの代表的な役割を示した. phosphatidyl-inositol (PtdIns) phosphatase (金色丸形), アクチンあるいは中間フィラメントへの結合と安定化 (青四角形), GDP-GTP変換因子 (GEF: 桃色五角形), GTPase活性化因子 (GAP: 黄色三角形).

(B) Zipper mechanismによる細菌の細胞侵入.



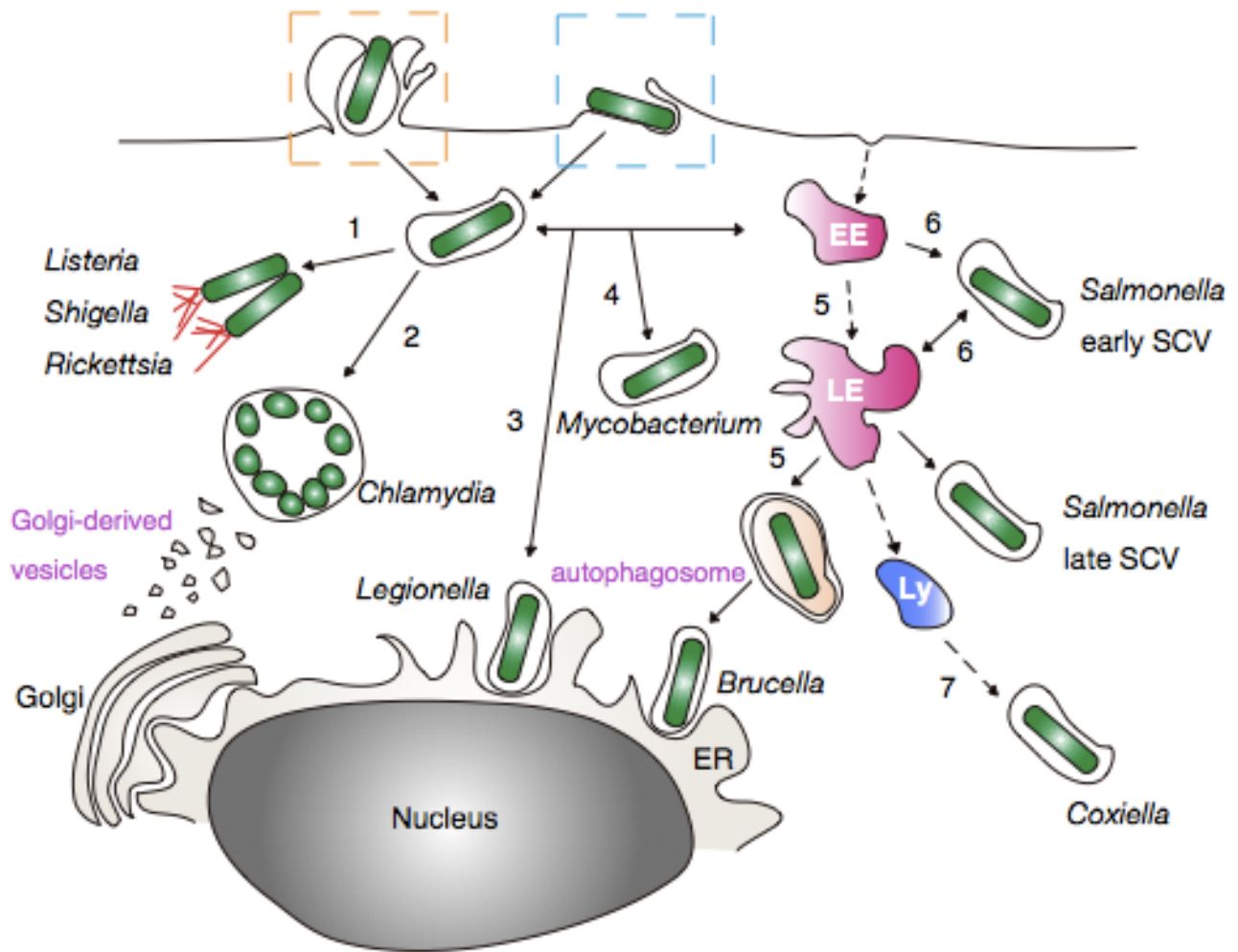


図2 細菌の細胞侵入と細胞内生存機構

1. 細菌は細胞質内へと脱出し、アクチン尾部によって移動する。
2. エンドサイトーシス経路から隔離され、ゴルジ体由来の小胞との相互作用によって特別なvacuoleが形成される。
3. 初期エンドソーム (EE)段階でエンドサイトーシス経路から隔離され、小胞体 (ER)様ファゴソームを形成する。
4. 初期エンドソーム段階でファゴソームの成熟を停止させる。
5. 後期エンドソーム (LE)段階でエンドサイトーシス経路から隔離され、小胞体様ファゴソームへと移行する。
6. ファゴソームの成熟を一過性に停止させることでEE→LEへの成熟が停止する。SCV: *Salmonella* containing vacuole
7. ファゴソームの成熟がリソソーム (Lys)と融合後に完成する。

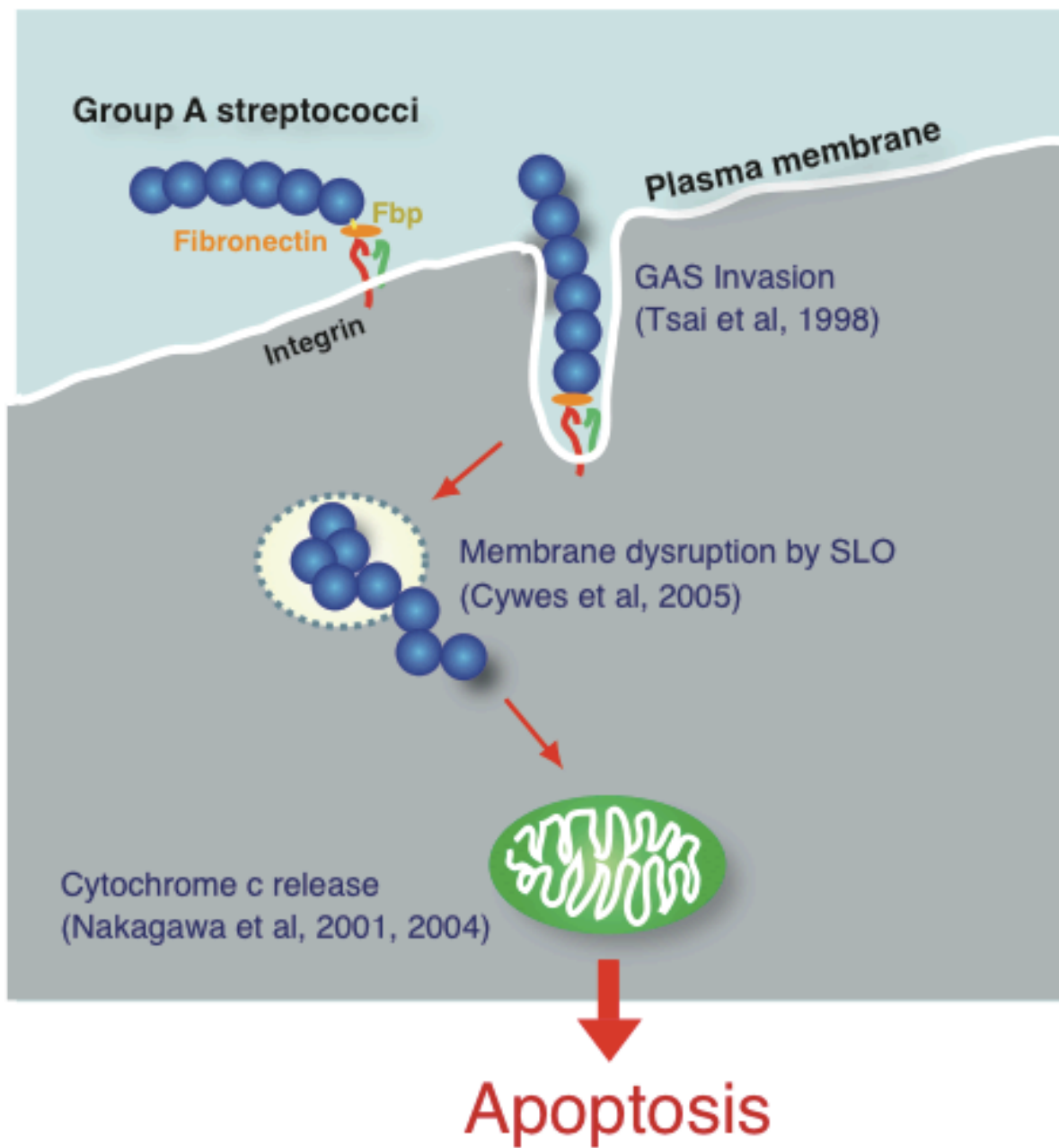


図3 GAS感染と細胞死の関連

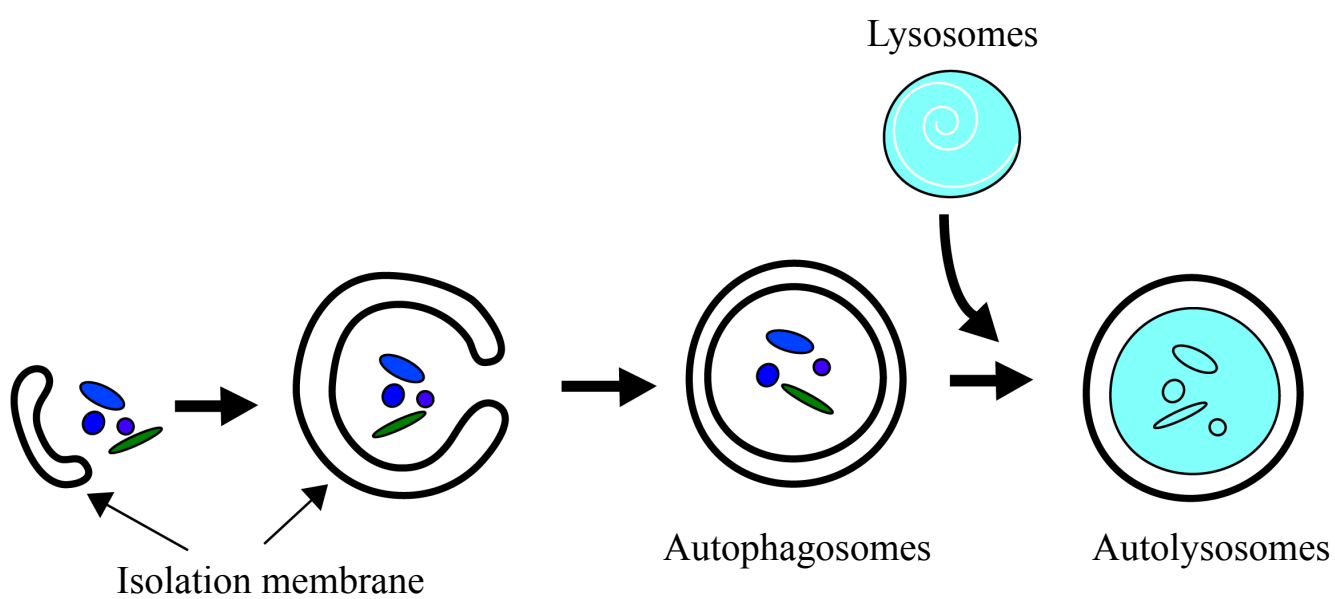


図4 オートファジーの模式図

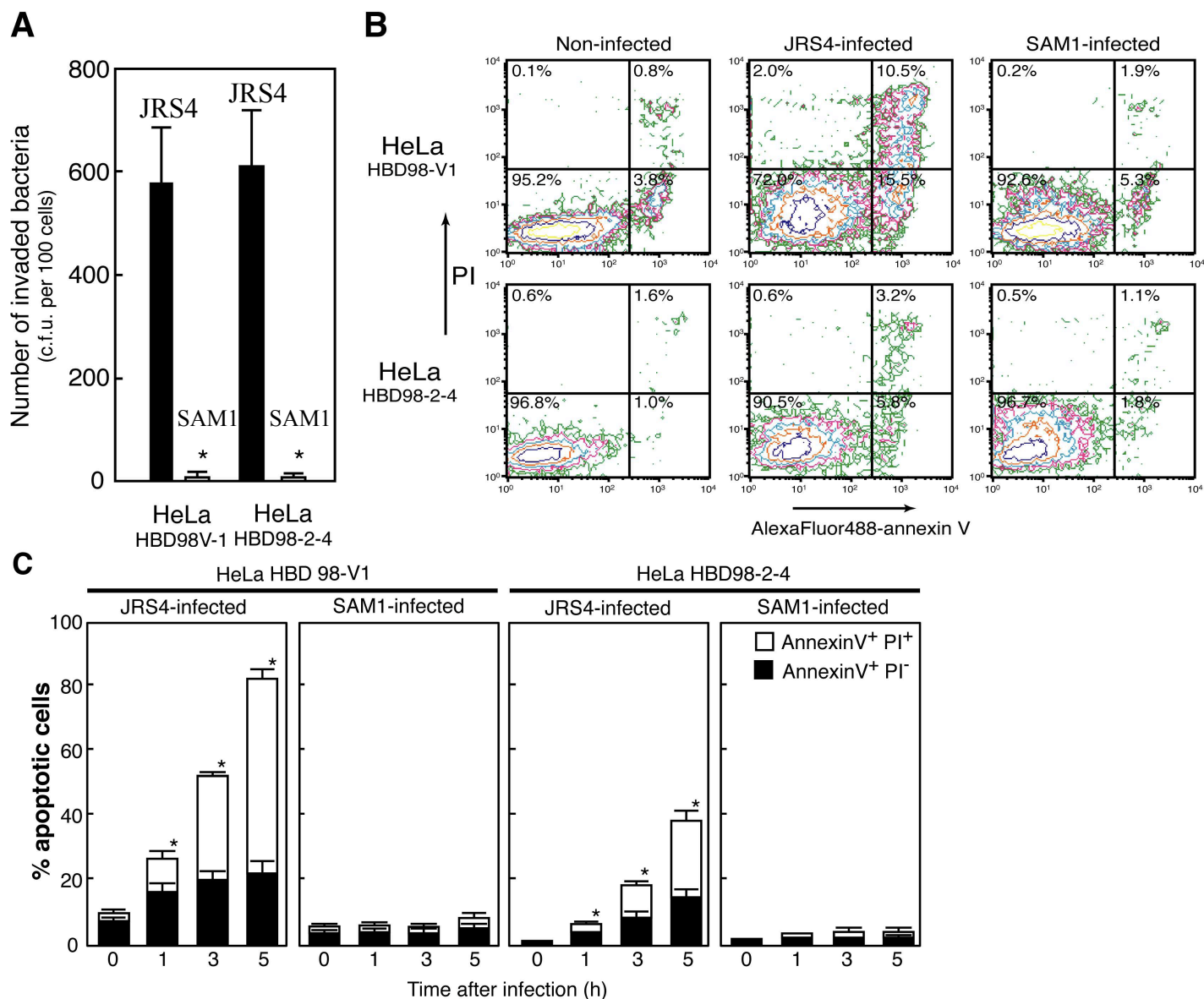
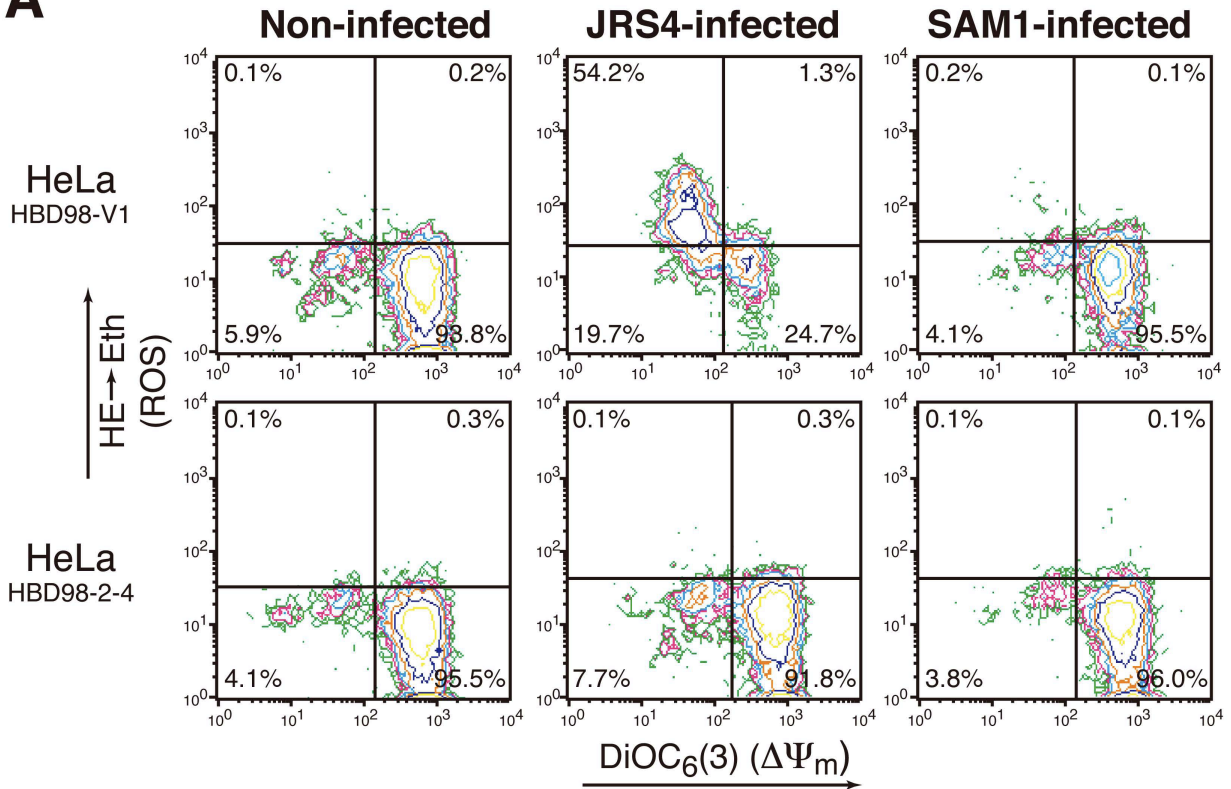
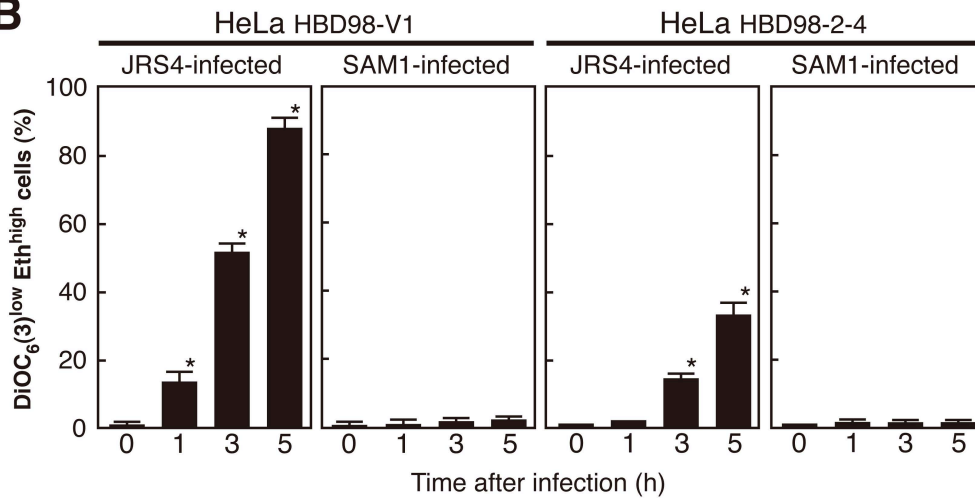


図5 GASの細胞侵入は細胞死を誘導する

(A) HeLa HBD98V-1 (Control vector発現)あるいはHeLa HBD98-2-4細胞にJRS4株あるいはSAM1株 (フィブロネクチン結合タンパク質F1欠損)を感染させ、感染3時間後の細胞内に侵入した菌数を算出した。実験は $n = 3$ で行った。\* $P < 0.05$

(B) HeLa HBD98V-1及びHBD98-2-4細胞にGASを感染させ、AnnexinV及びPI染色によって細胞死の検出を行った。感染時間: 3時間

(C) GASを感染させた両細胞において細胞死を起こした細胞を経時的に観察した。実験は $n = 3$ で行った。\* $P < 0.05$

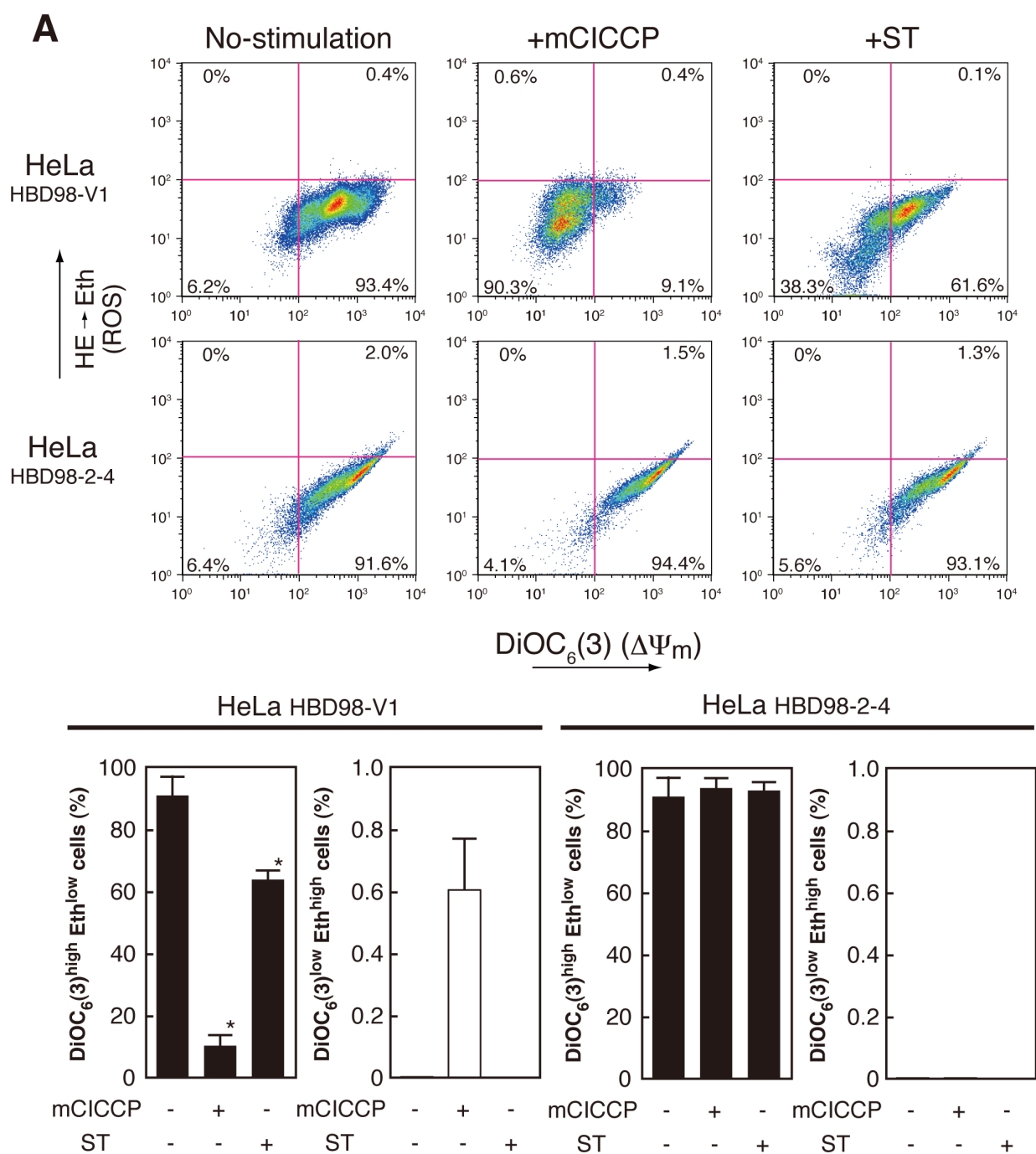
**A****B**

**図6 GASの細胞侵入は活性酸素種 (ROS)の増加とミトコンドリアの膜電位の低下を誘導する**

(A) HeLa HBD98V-1及びHeLa HBD98-2-4細胞にJRS4株あるいはSAM1株を感染させ、感染3時間後にDiOC<sub>6</sub>(3)及びEthによる染色された細胞をフローサイトメータによって観察した

(B) HeLa HBD98V-1及びHBD98-2-4細胞にGASを感染させた。経時的にDiOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup>Eth<sup>high</sup>細胞の検出を行った。実験はn = 3で行った。

\**P* < 0.05



**図7 mCICCPあるいはStaurosporineによるROS産生の関連**

- (A) HeLa HBD98V-1及びHeLa HBD98-2-4細胞をcarbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (mCICCP)あるいはStaurosporine (ST)で処理した. 3時間後にDiOC<sub>6</sub>(3)及びEthによる染色された細胞をフローサイトメータによって観察した
- (B) HeLa HBD98V-1及びHBD98-2-4細胞mCICCPあるいはSTで3時間処理した. この時の, DiOC<sub>6</sub>(3)<sup>high</sup>Eth<sup>low</sup>あるいはDiOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup>Eth<sup>high</sup>細胞の検出を行った. 実験はn = 3で行った. \*P < 0.05

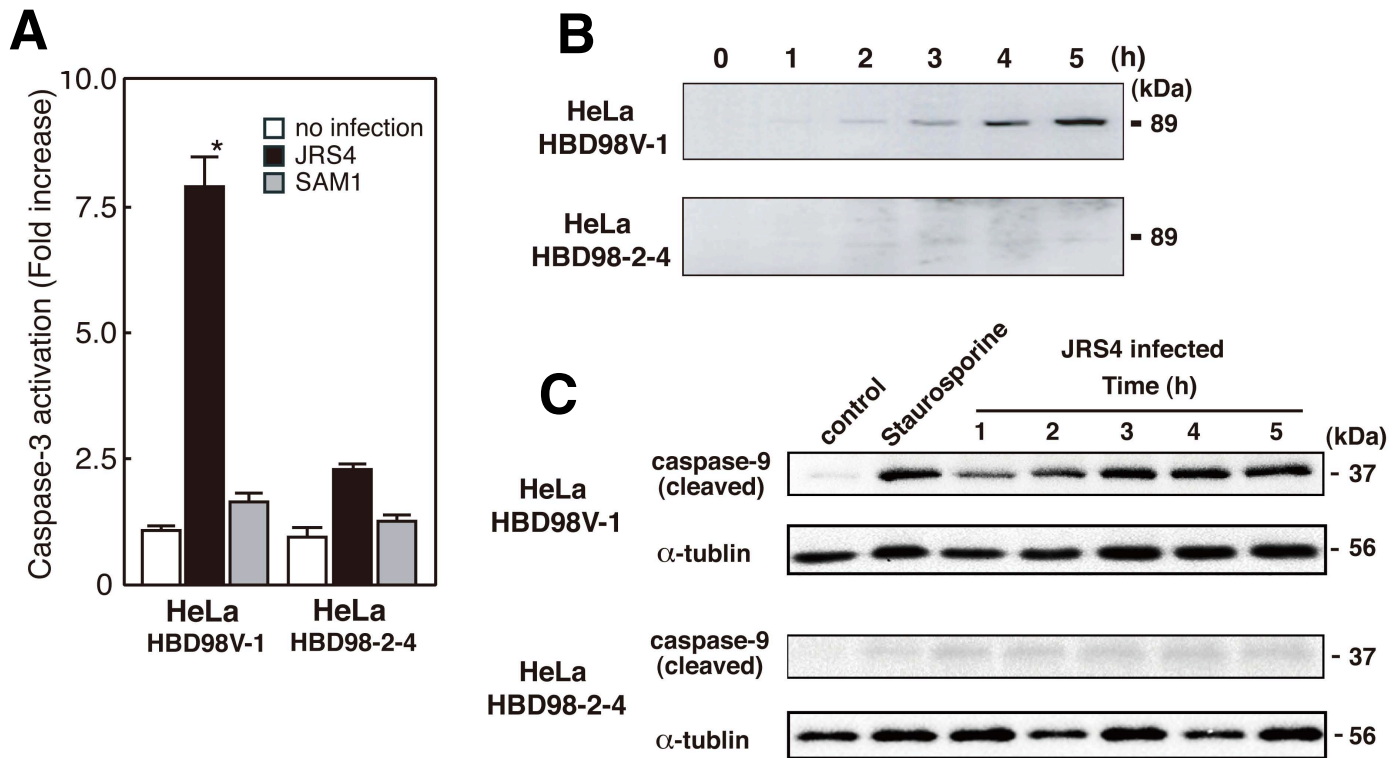
**表3 GASの細胞侵入はROS産生を増加させる**

GAS strains or stimulant	J-aggregate-positive cells (%)			
	HeLa HBD98V-1		HeLa HBD98-2-4	
	1h	3h	1h	3h
Control	N.D.	86.2 ± 2.2	N.D.	87.2 ± 1.8
JRS4	52.5 ± 3.4	1.8 ± 0.4	81.8 ± 3.3	68.7 ± 6.2
SAM1	84.9 ± 3.2	78.7 ± 4.2	84.1 ± 2.6	85.6 ± 2.1
Staurosporine (5 μM)	N.D.	31.1 ± 3.3	N.D.	59.3 ± 3.3

N.D., not determined

HeLa HBD98V-1及びHBD98-2-4細胞にGASを感染させた. ミトコンドリア膜電位の低下の測定について, JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) 色素を使用した染色により定量化した. 各感染時間に回収した細胞にJC-1を加え15分間染色した.





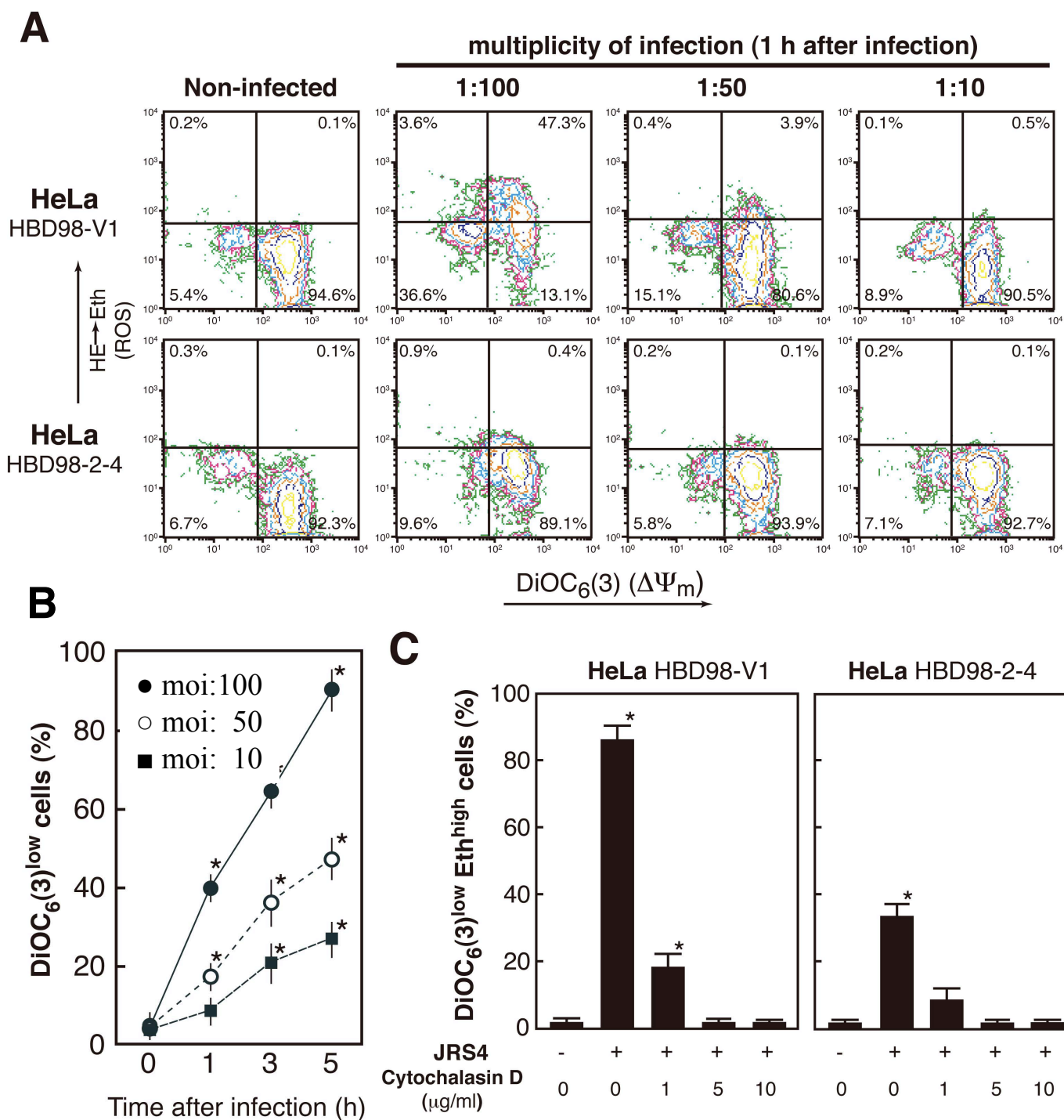
**図8 GASの細胞侵入はCaspase-3/9の活性化を誘導する**

(A) HeLa HBD98V-1及びHBD98-2-4細胞にGASを感染させた. 感染3時間後のcaspase-3/-7の活性化は, 特異的合成基質であるAc-Asp-Glu-Thy-Asp-MCA (DEVD)の分解を蛍光リーダーを用いて測定した.

実験はn = 3で行った. \* $P < 0.05$

(B, C) 両細胞にJRS4株を感染させた. 経時的なcaspase-3によるpoly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の分解とcaspase-9の活性化は, それぞれに特異的なcleaved-PARP, cleaved-caspase-9抗体を用いてwestern blottingにより検出した.



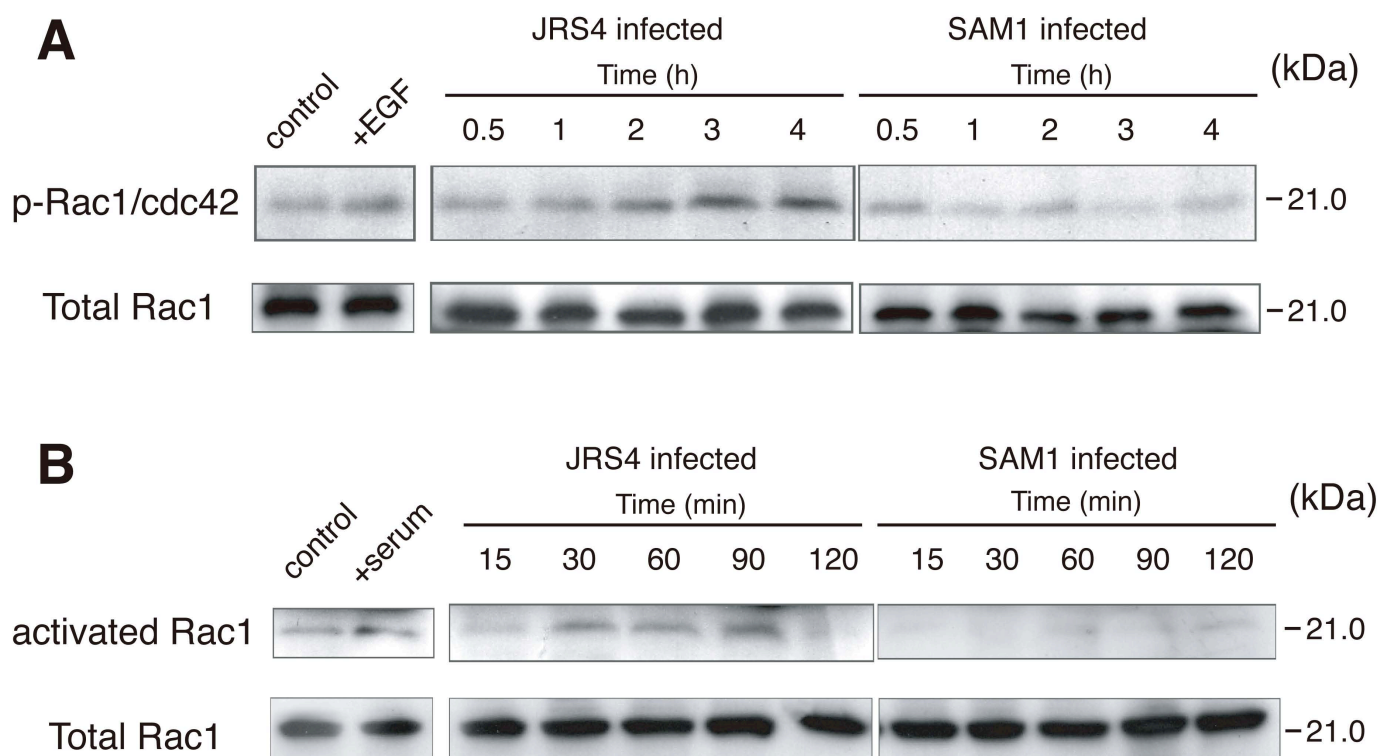


**図9 GASの感染量に比例してROS増加とミトコンドリアの膜電位低下が誘導される**

(A) HeLa HBD98V-1及びHeLa HBD98-2-4細胞にJRS4株を様々な感染量で感染させ、感染3時間後に $\text{DiOC}_6(3)$ 及びEthによる染色された細胞をフローサイトメーターによって検出した。

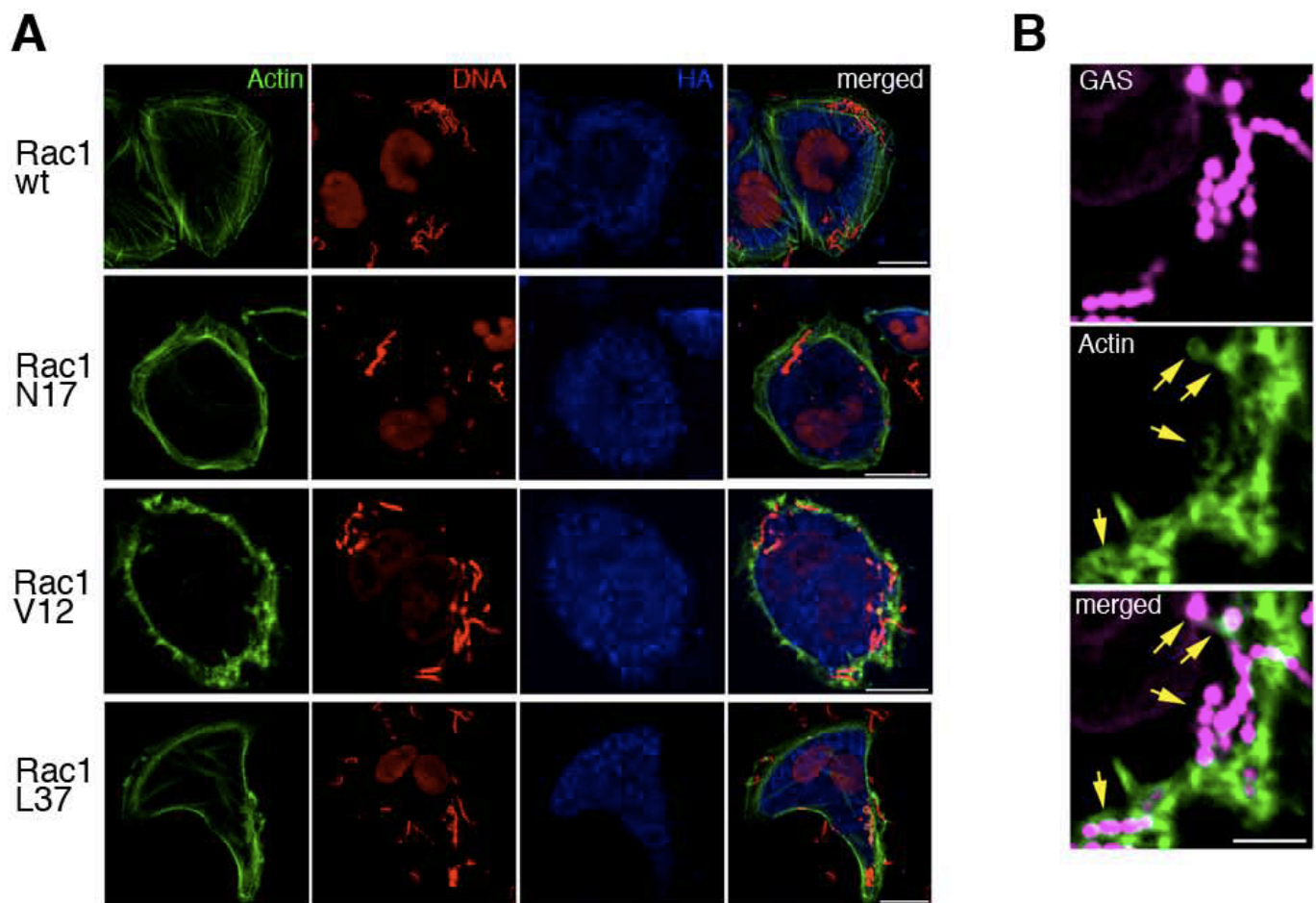
(B) 両細胞に感染量の異なるJRS4株を感染させ、経時的に $\text{DiOC}_6(3)^{\text{low}}\text{Eth}^{\text{high}}$ 細胞の検出を行った。実験は $n = 3$ で行った。\* $P < 0.05$

(C) Cytochalasin Dで処理した両細胞にJRS4株を感染させ、経時的に $\text{DiOC}_6(3)^{\text{low}}\text{Eth}^{\text{high}}$ 細胞の検出を行った。実験は $n = 3$ で行った。\* $P < 0.05$



**図10 GAS感染によってsmall GTPase Rac1の活性化が誘導される**

- (A) HeLa HBD98V-1細胞にJRS4株あるいはSAM1株を感染させた. 経時的なRac1のリン酸化レベルを特異的な抗Rac1抗体を用いてwestern blottingにより検出した.
- (B) HeLa HBD98V-1細胞にJRS4株あるいはSAM1株を感染させた. PAKに結合させたアガロースビーズをGAS感染細胞溶解液に加え, 抗Rac1抗体によって免疫沈降させた. またコントロールとして, GTPを加えた細胞溶解液を使用した.



**図11 Rac1はGASの細胞侵入部位においてアクチンの再構築を誘導する**  
 (A) 種々のRac1変異体 (Rac1 wt, Rac1 N17: dominant negative, Rac1 V12: dominant active, Rac1 L37)を発現させたHeLa HBD98V-1細胞にJRS4株を感染させた. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて, GASの細胞侵入部位へのアクチンのリクルートをAlexaFluor488-conjugated phalloidinで染色することで観察した.  
 (B) JRS4株の細胞侵入部位の顕微鏡像.



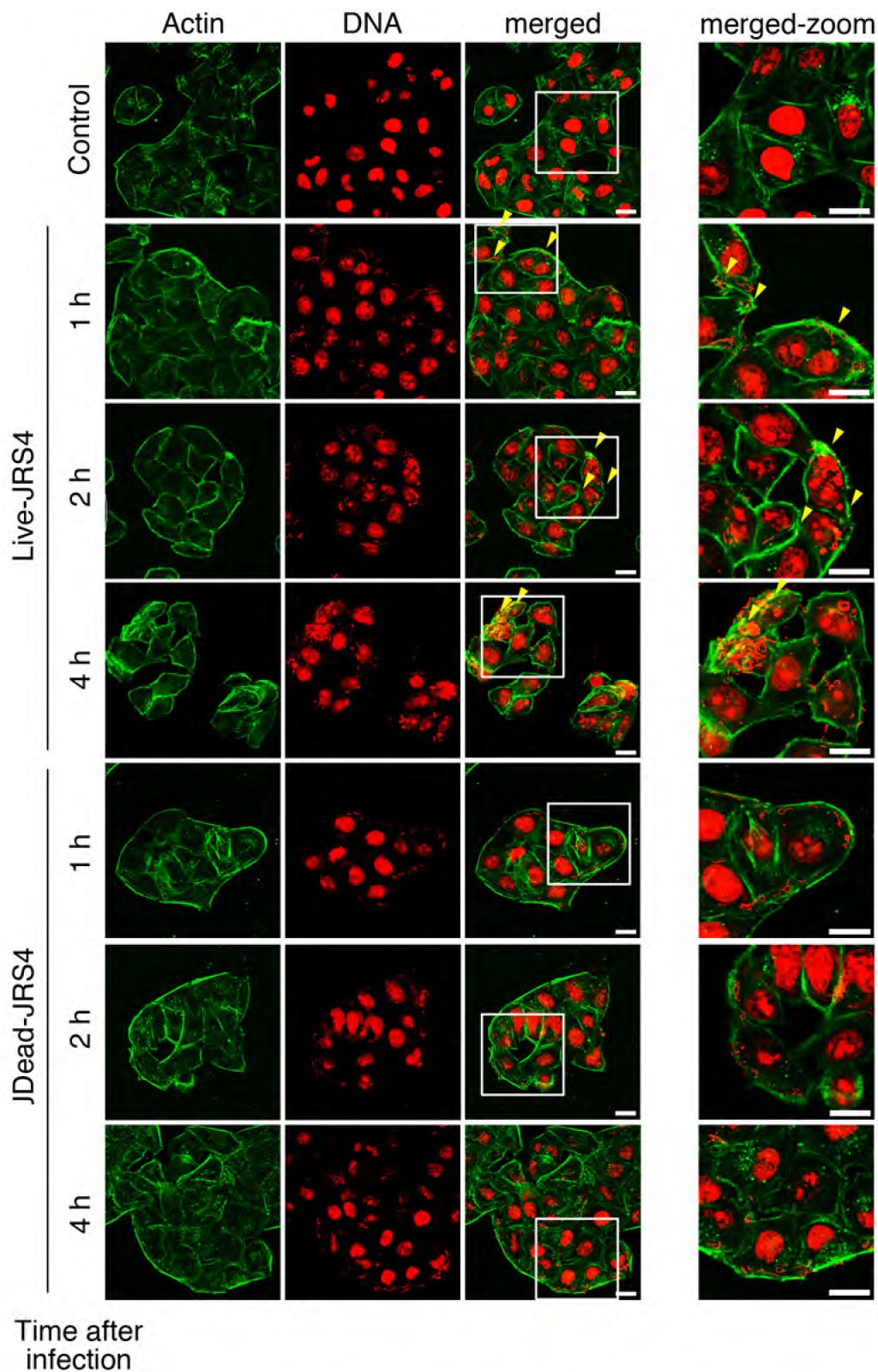


図12 生菌と死菌による細胞侵入 (JRS4)

HeLa HBD98V-1細胞にJRS4株の生菌あるいは死菌を感染させた. 感染後の細胞内のGAS (PI)及びアクチンのリクルート (AlexaFl uor488-conjugated phalloidin)を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した.  
スケールバー: 10  $\mu$ m

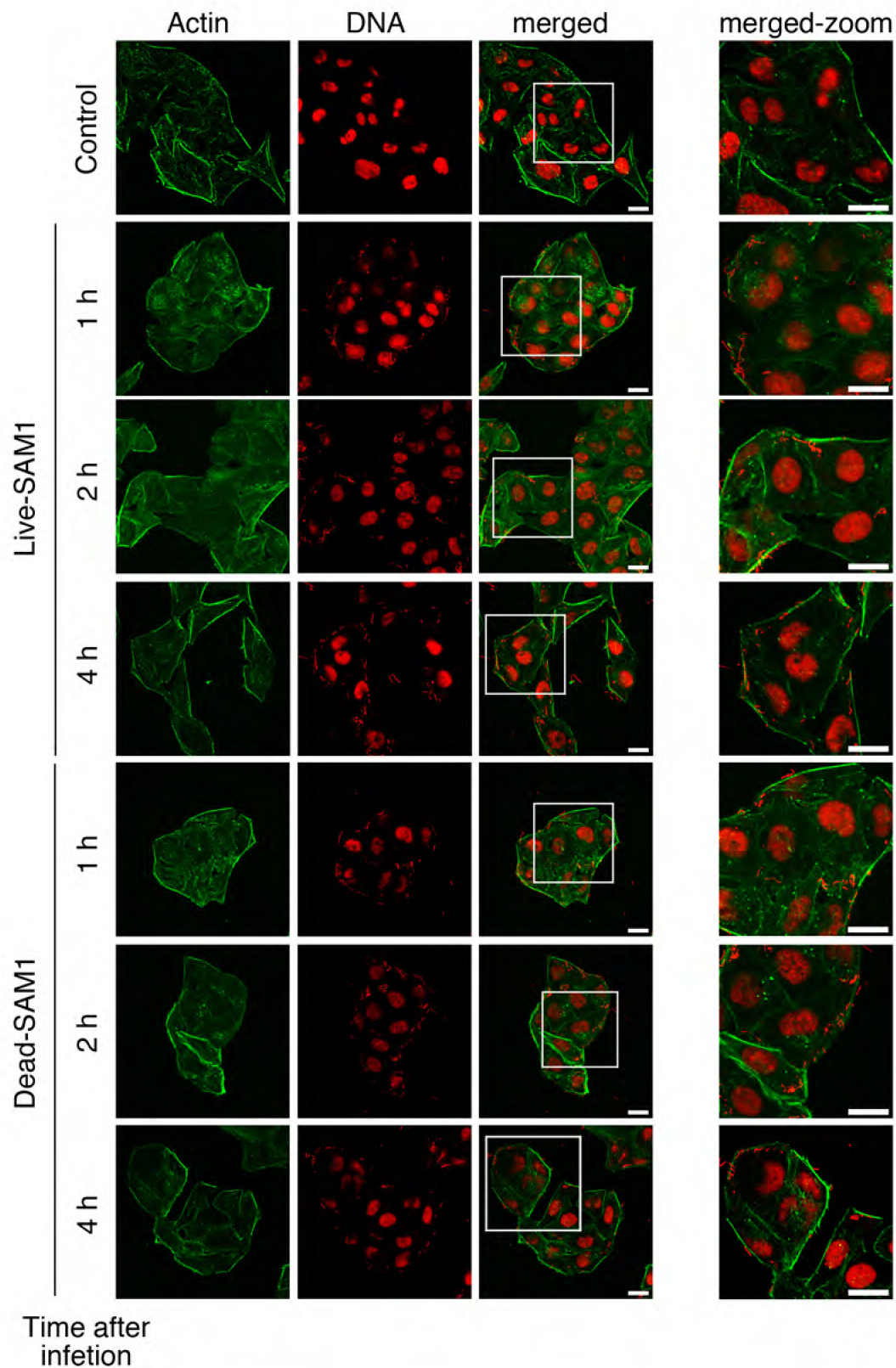
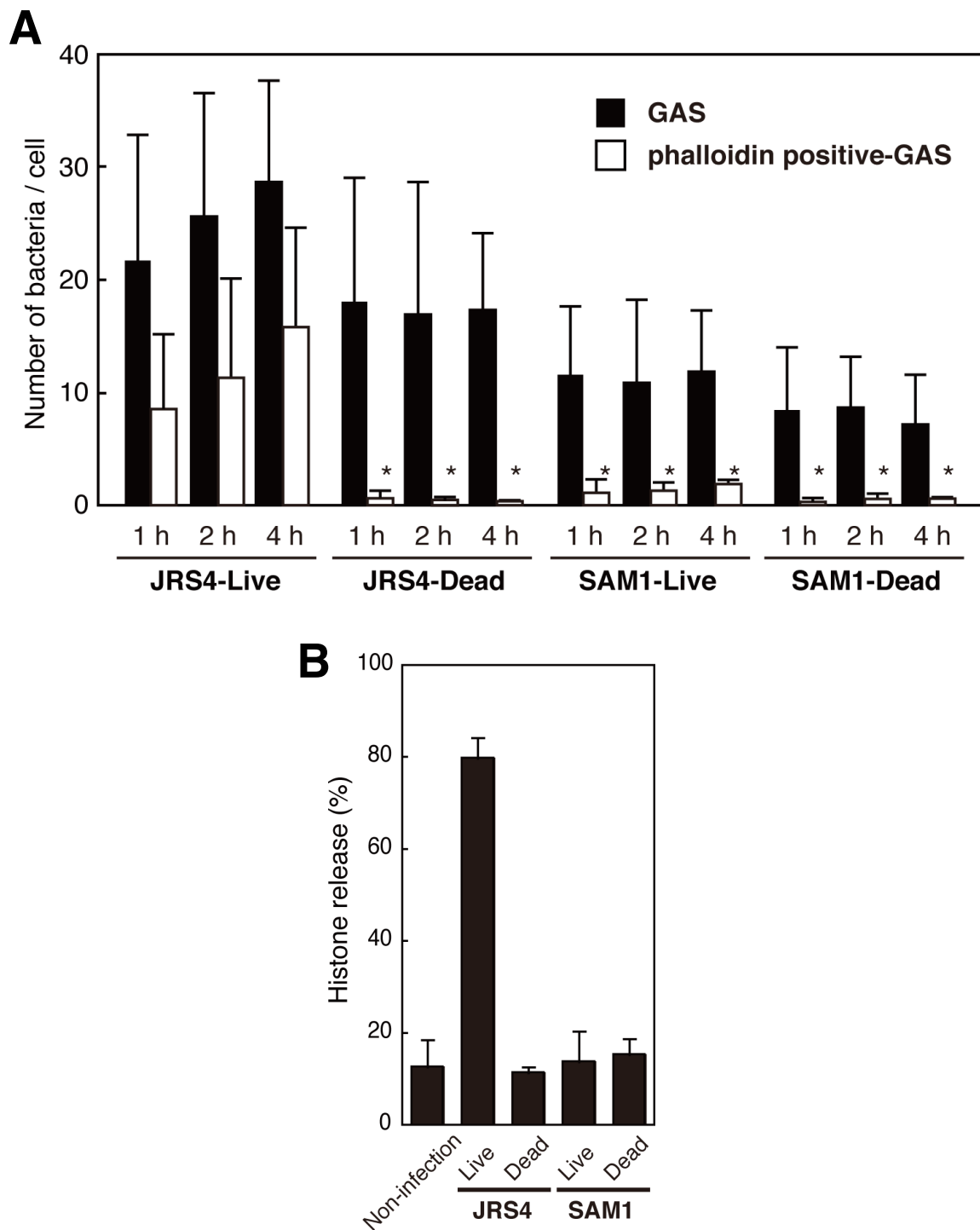


図13 生菌と死菌による細胞侵入 (SAM1)

HeLa HBD98V-1細胞にSAM1株の生菌あるいは死菌を感染させた。感染後の細胞内のGAS (PI)及びアクチンのリクルート (AlexaFluor488-conjugated phalloidin)を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。スケールバー: 10  $\mu\text{m}$



**図14 死菌は細胞侵入できず細胞死も誘導しない**

(A) HeLa HBD98V-1 細胞に JRS4株あるいはSAM1株の生菌及び死菌を感染させ、感染後の細胞内に侵入した菌数を算出した。また、同時にGASとアクチンとの共局在率も算出した。実験はn = 3で行った。\* $P < 0.05$

(B) HeLa HBD98V-1 細胞に JRS4株あるいはSAM1株の生菌及び死菌を感染させ、histone releaseを指標としたELISA法によって細胞死の検出を行った。感染時間: 5時間。実験はn = 3で行った。