

**図15 Rac1は効率的にGASを細胞内に侵入させ、NADPH oxidaseを活性化させることでROS産生を増加させる**

- (A) 種々のRac1変異体 (Rac1 wt, Rac1 N17, Rac1 V12, Rac1 L37, Rac1 L61: dominant active, Rac1 V12/L61, Rac1 V12/L37)を発現させたHeLa HBD98V-1細胞にJRS4株を感染させた。感染2時間後に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) (A)の条件下で感染5時間後のDiOC<sub>6</sub>(3)<sup>low</sup>Eth<sup>high</sup> 細胞の検出を行った。

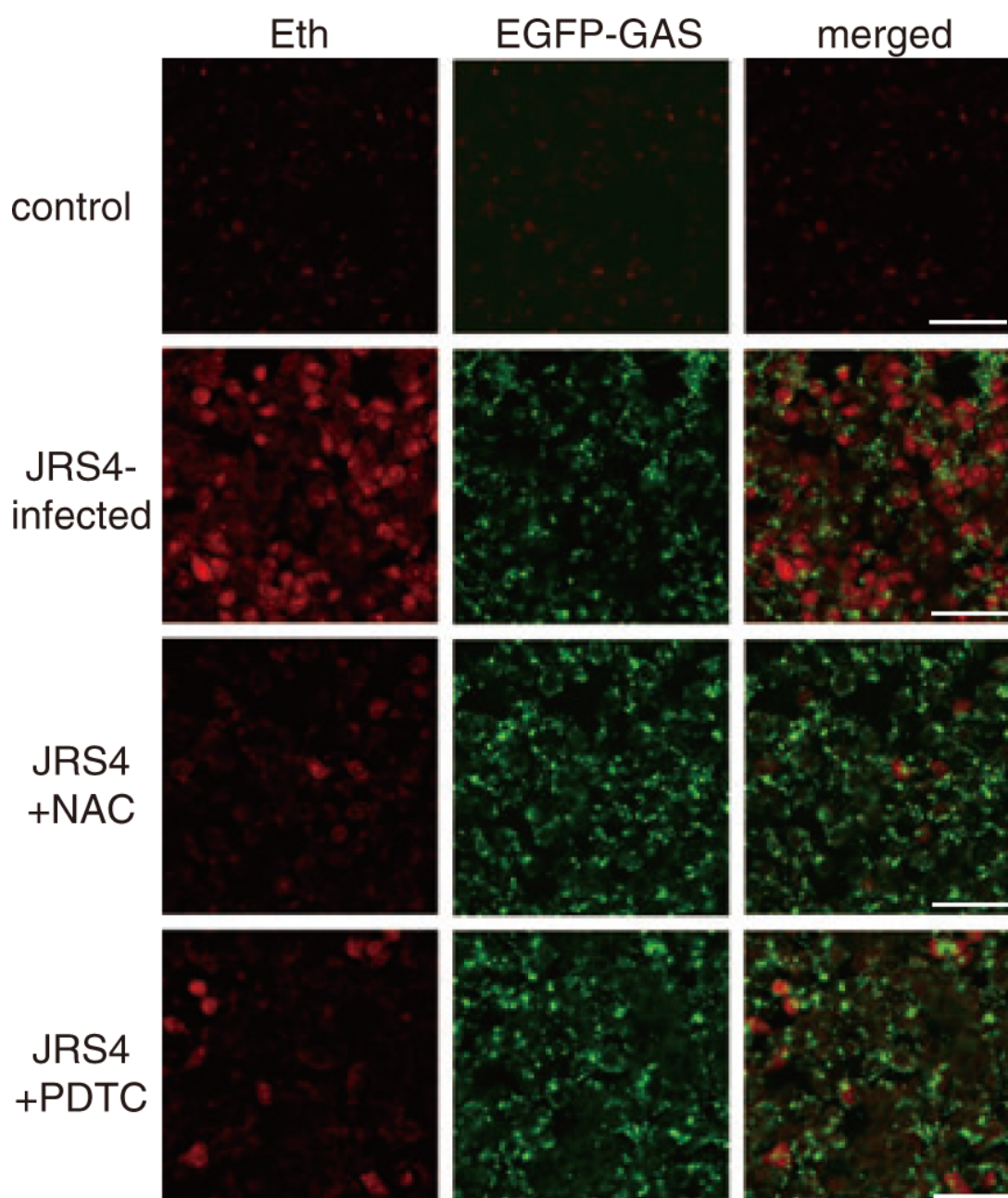


図16 ROS阻害剤とGAS感染による細胞死の関連

ROS阻害剤であるNACあるいはPDTCによって処理したHeLa HBD98V-1細胞にJRS4株を感染させた. 感染5時間後の細胞内のGAS及びEth陽性細胞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: 20  $\mu\text{m}$

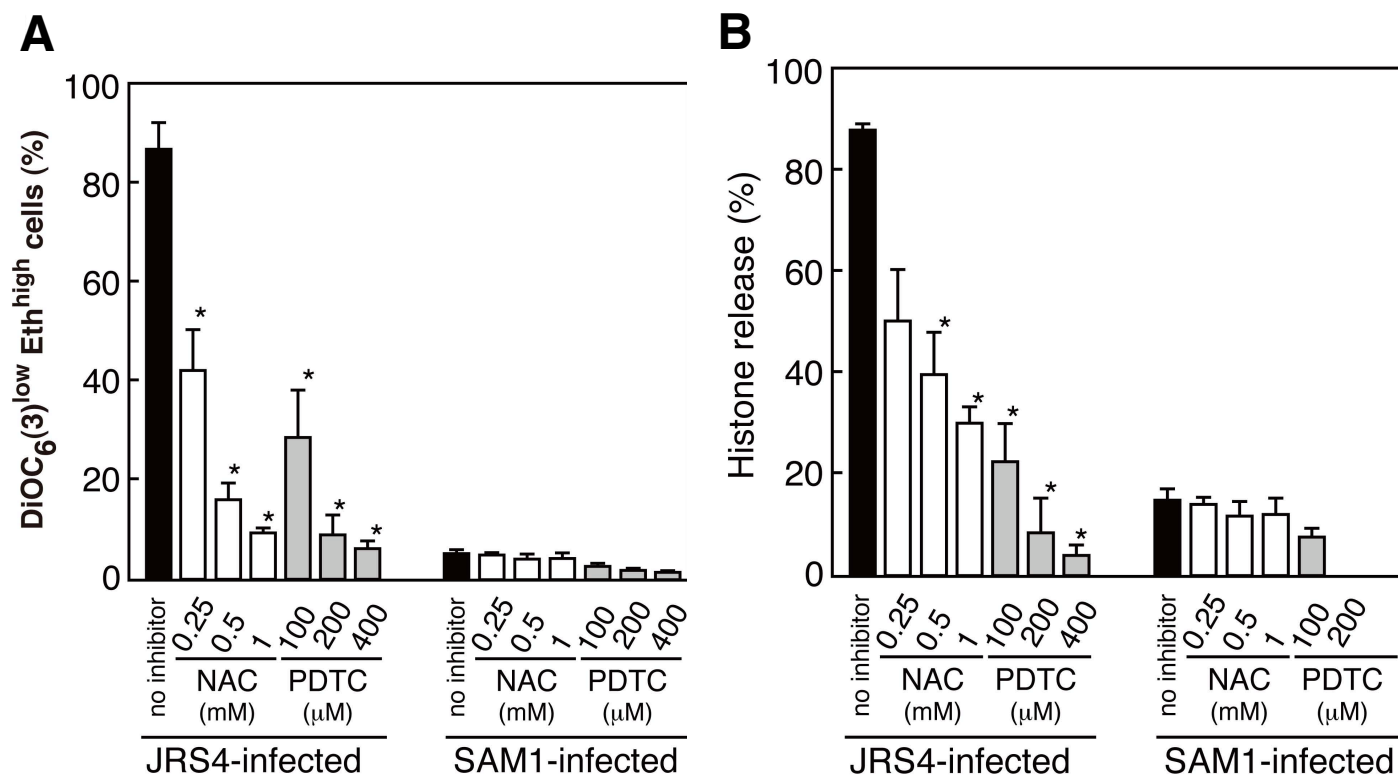
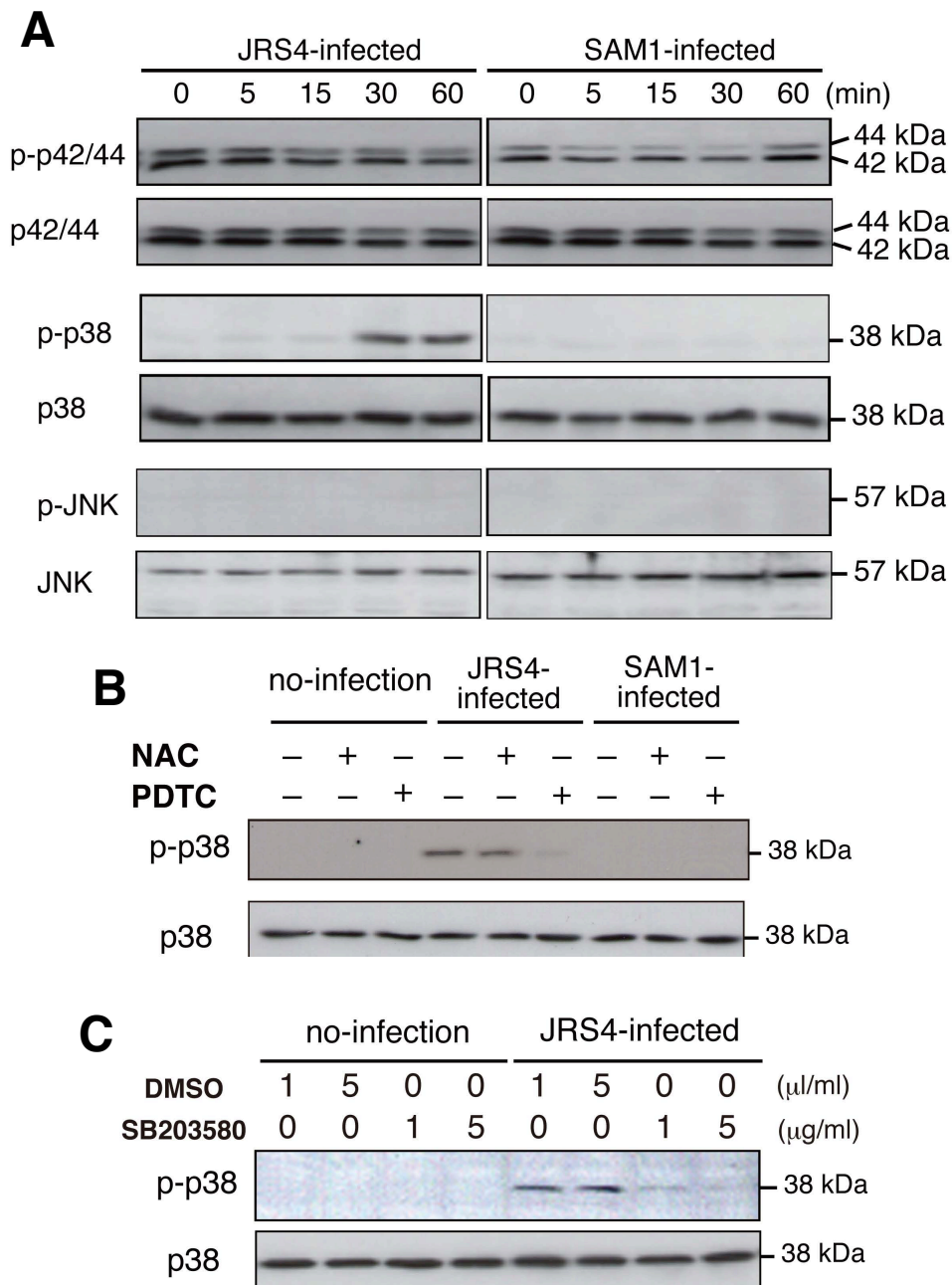


図17 ROS阻害剤はGAS感染による細胞死を抑制する

(A) ROS阻害剤であるNACあるいはPDTCによって処理したHeLa HBD98V-1細胞にJRS4株を感染させた.感染5時間後の 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.

\* $P < 0.05$

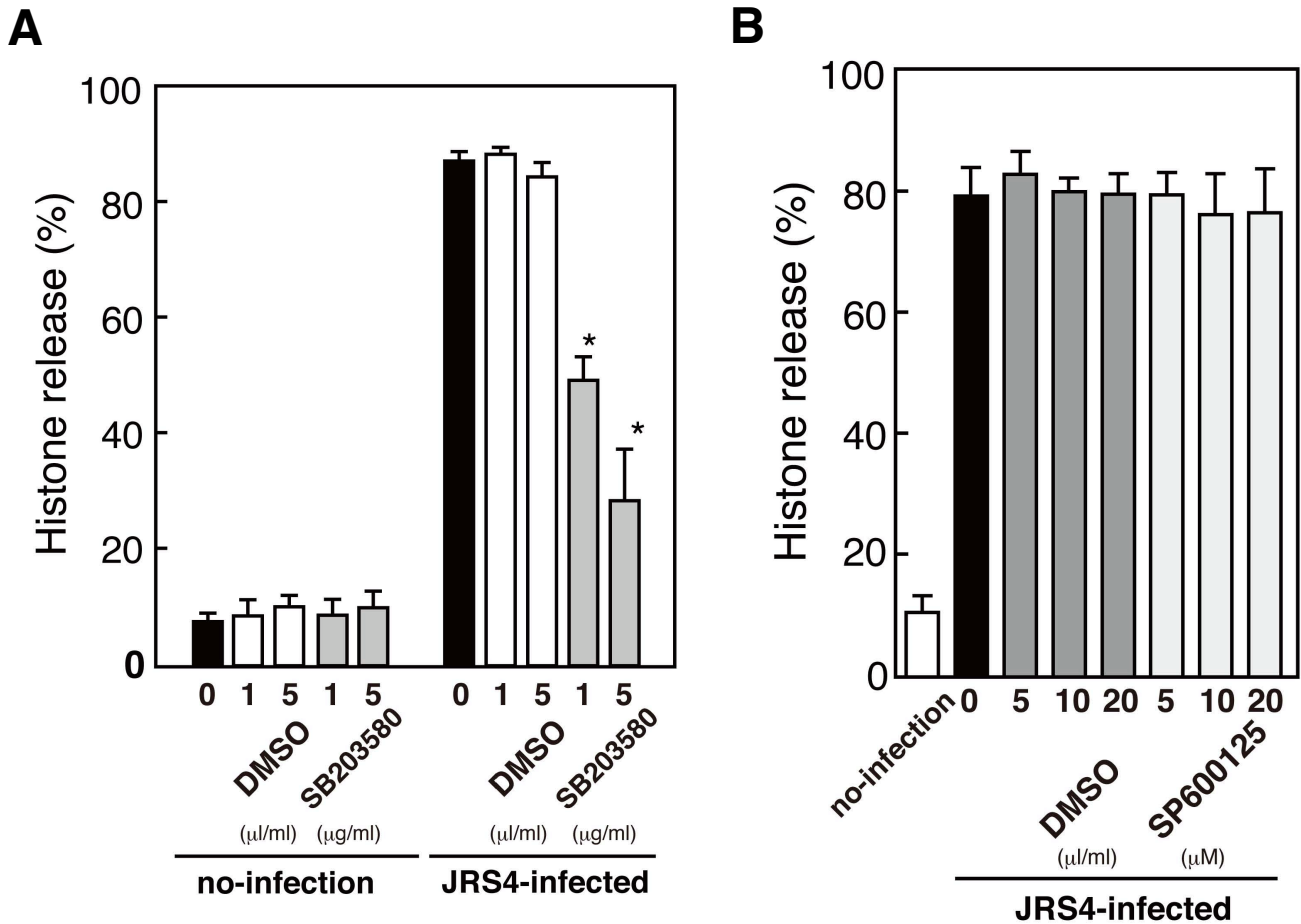
(B) (A)の条件下で感染5時間後の細胞死をhistone releaseを指標とした ELISA法を用いて検出した. 実験はn = 3で行った. \* $P < 0.05$



**図18 GAS感染によってp38MAPKが活性化される**

- (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p38MAPK及びJNKのリン酸化レベルをそれぞれに特異的な抗体を用いてwestern blottingにより検出した.
- (B) NACあるいはPDTCで処理したHeLa HBD98V-1細胞にJRS4株あるいはSAM1株を感染させた. p38MAPKのリン酸化を特異的な抗体を用いてwestern blottingにより検出した.
- (C) p38MAPK阻害剤であるSB2053580で処理した細胞にJRS4株を感染させた. p38MAPKのリン酸化を特異的な抗体を用いてwestern blottingにより検出した.





**図19 p38MAPK阻害剤はGAS感染による細胞死を抑制する**

- (A) p38MAPK阻害剤であるSB203580で処理したHeLa HBD98V-1細胞にJRS4株を感染させた. 感染5時間後の細胞死をhistone releaseを指標としたELISA法を用いて検出した. 実験はn = 3で行った. \* $P < 0.05$
- (B) JNK阻害剤であるSP600125で処理したHeLa HBD98V-1細胞にJRS4株を感染させた. 感染5時間後の細胞死をhistone releaseを指標としたELISA法を用いて検出した. 実験はn = 3で行った.

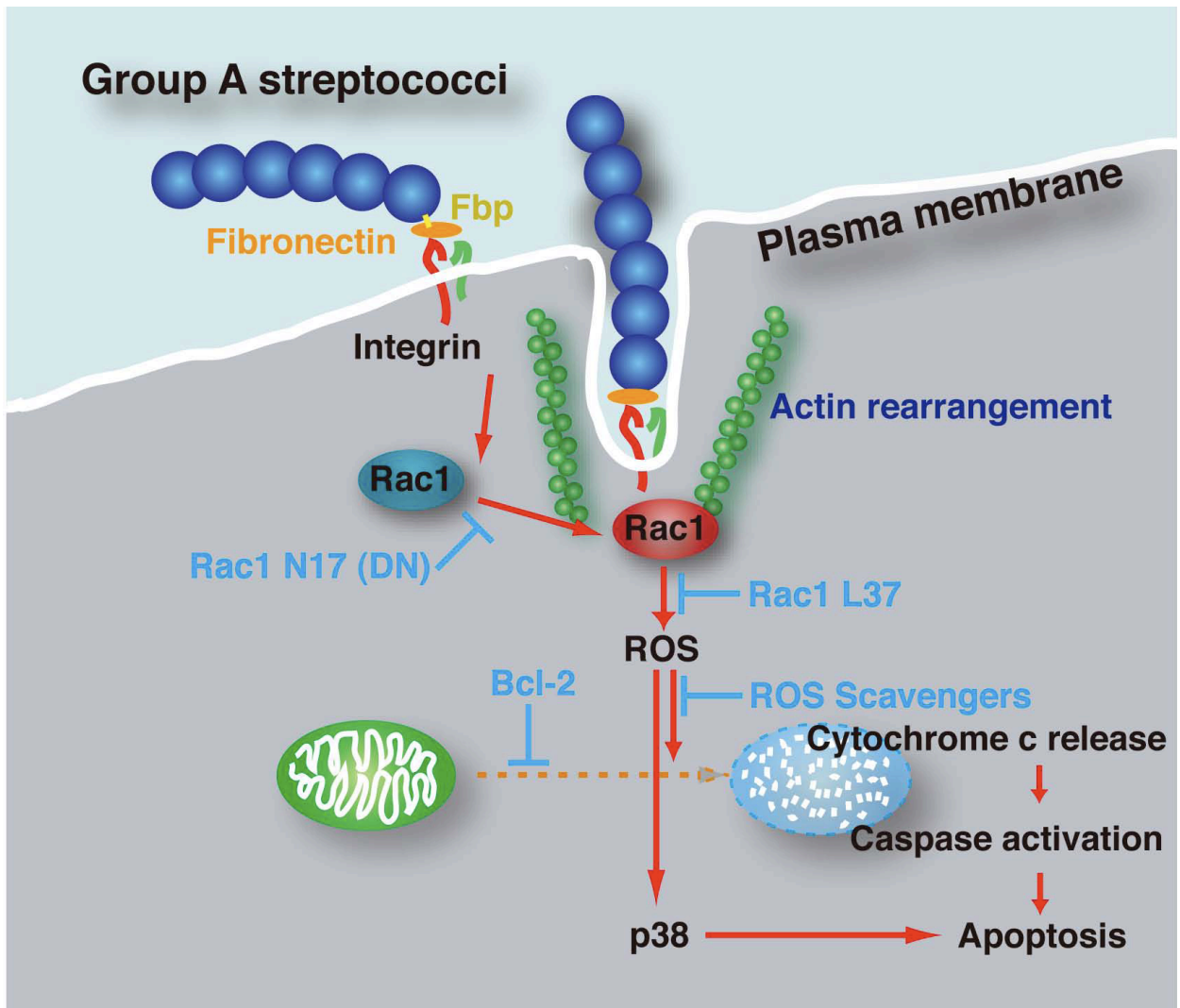


図20 GAS感染による細胞死誘導機構 模式図

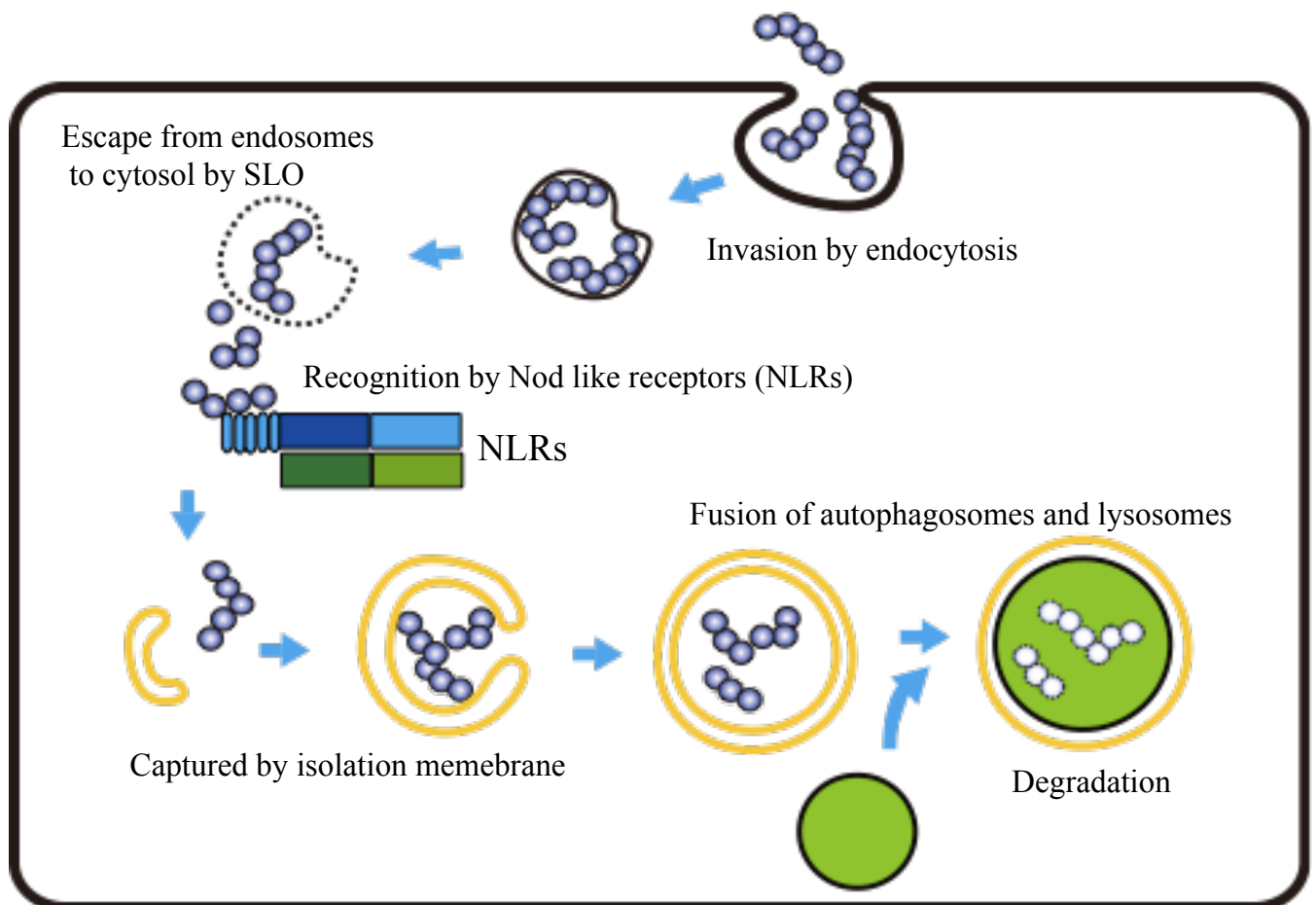


図21 A群レンサ球菌を分解するオートファジー

## NLRX1 is ...

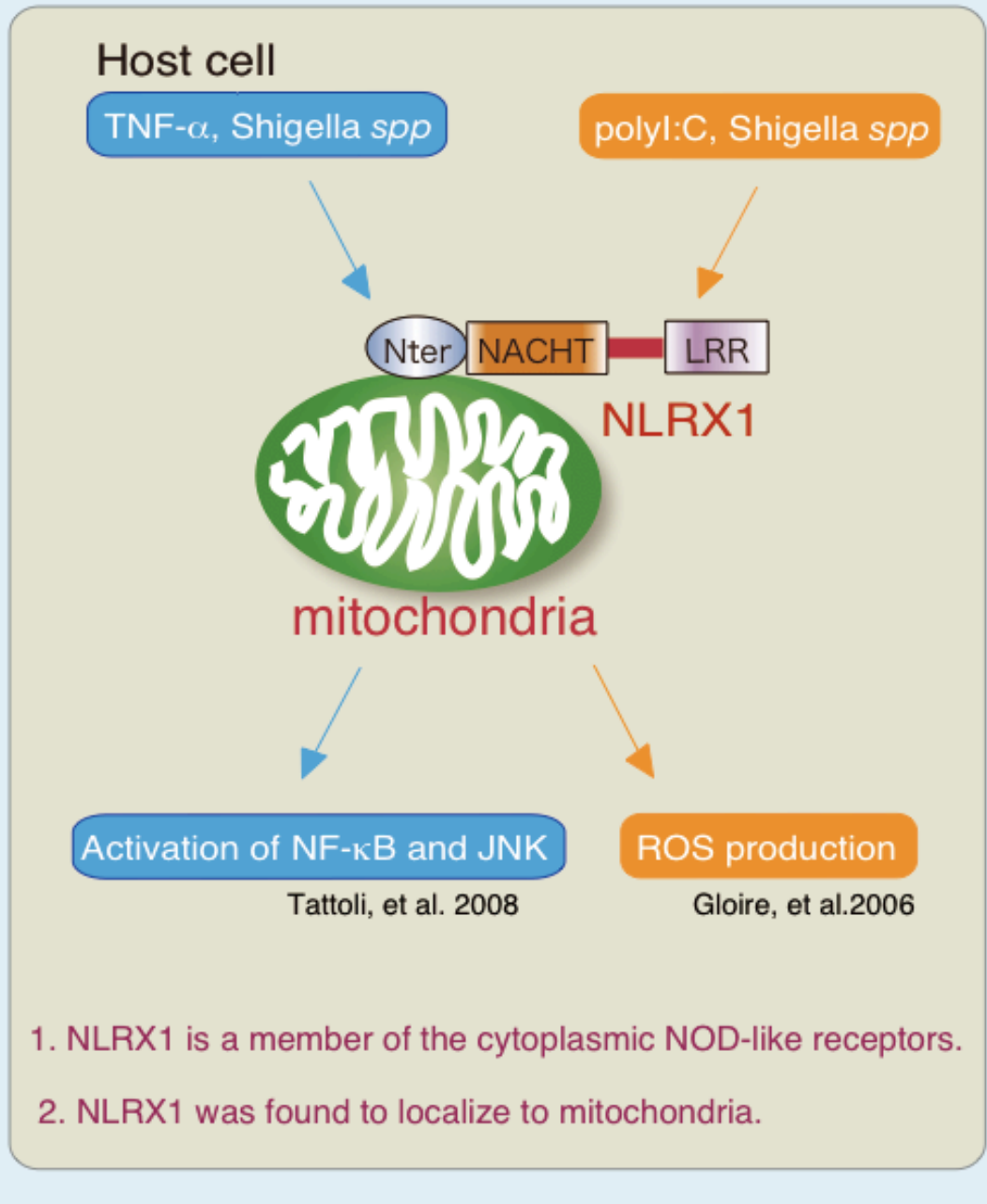
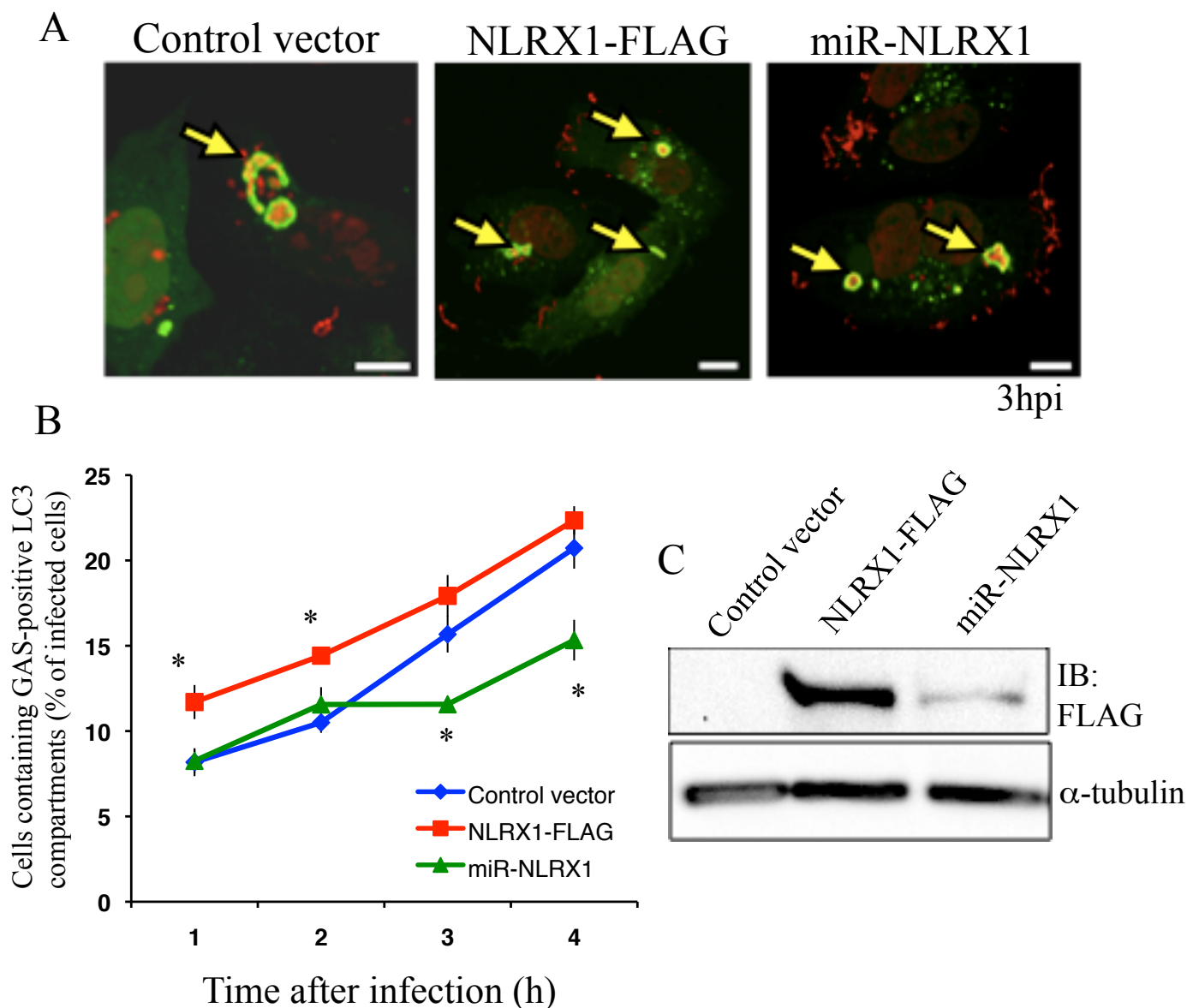


図22 NLRX1の役割 模式図



**図23 NLRX1強発現はGAS感染に対するオートファジーの誘導を促進する**

(A) NLRX1を強発現あるいはノックダウンさせたHeLa細胞にGASを感染させ、細胞質内の菌を囲うLC3 vacuoles ( GAS-containing LC3 vacuoles [GcLVs] )の形成を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した.

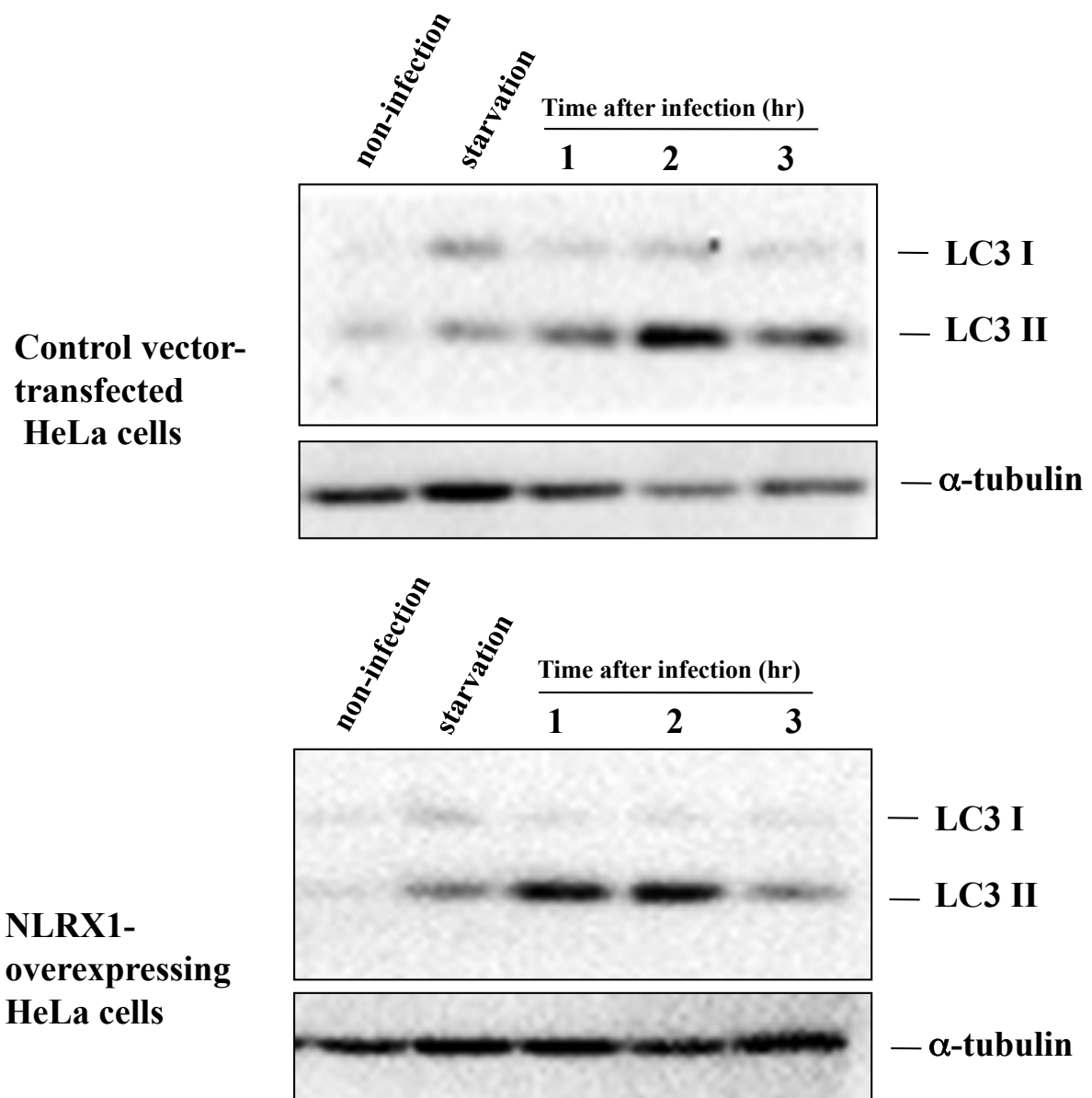
スケールバー: 10  $\mu$ m, 矢印: GcLVs, 感染時間: 3時間

(B) NLRX1強発現あるいはノックダウン細胞にGASを感染させ、経時的なGASの細胞内に侵入した細胞におけるGcLVsをカウントした.

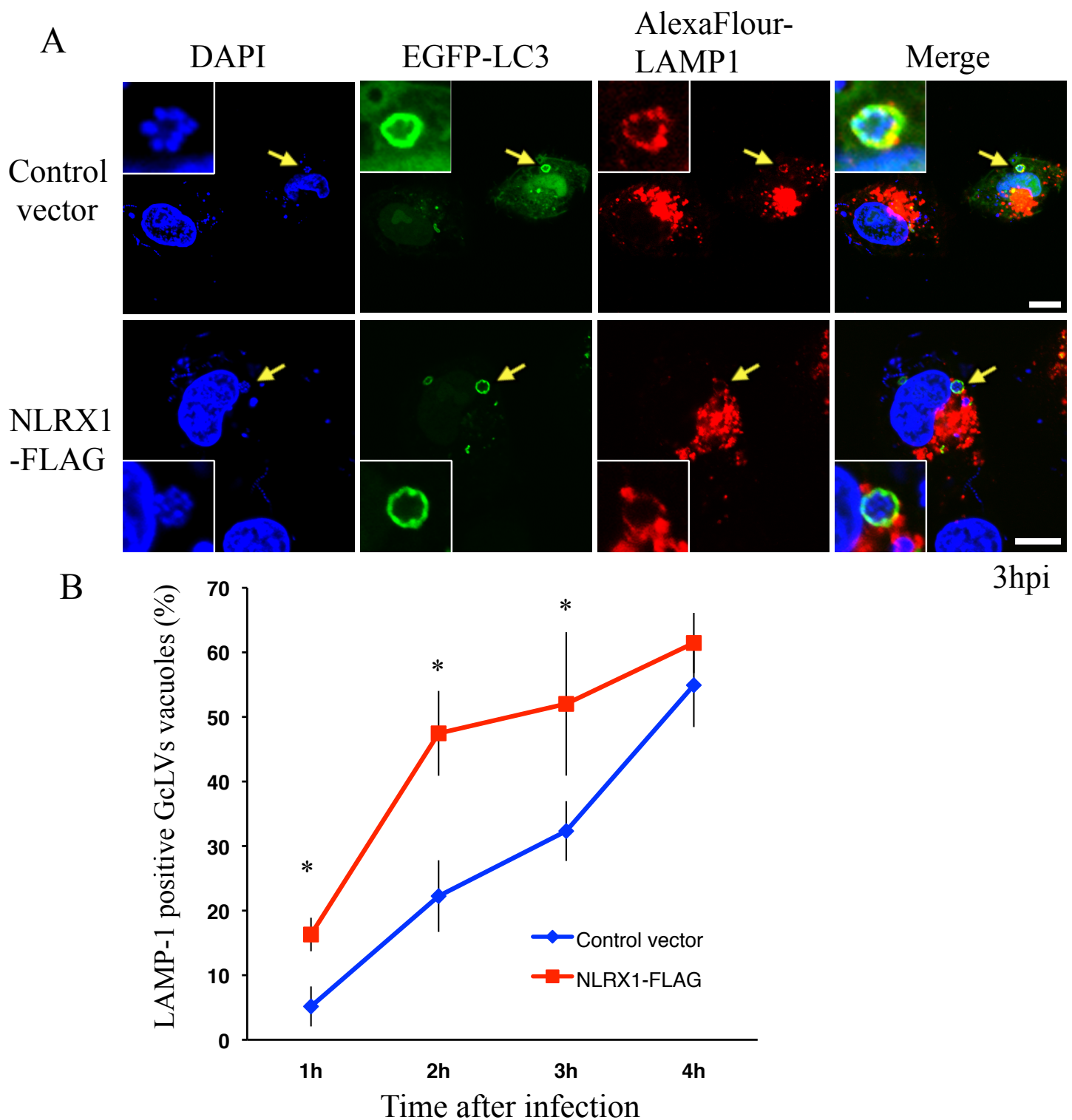
各々500個以上の細胞をカウントした. 実験はn = 3で行った. \* $P < 0.05$

(C) NLRX1の強発現 (NLRX1-FLAG)及びノックダウン (miR-NLRX1)を発現させたHeLa細胞の細胞溶解液を抗FLAG抗体によるWestern blottingに供した.





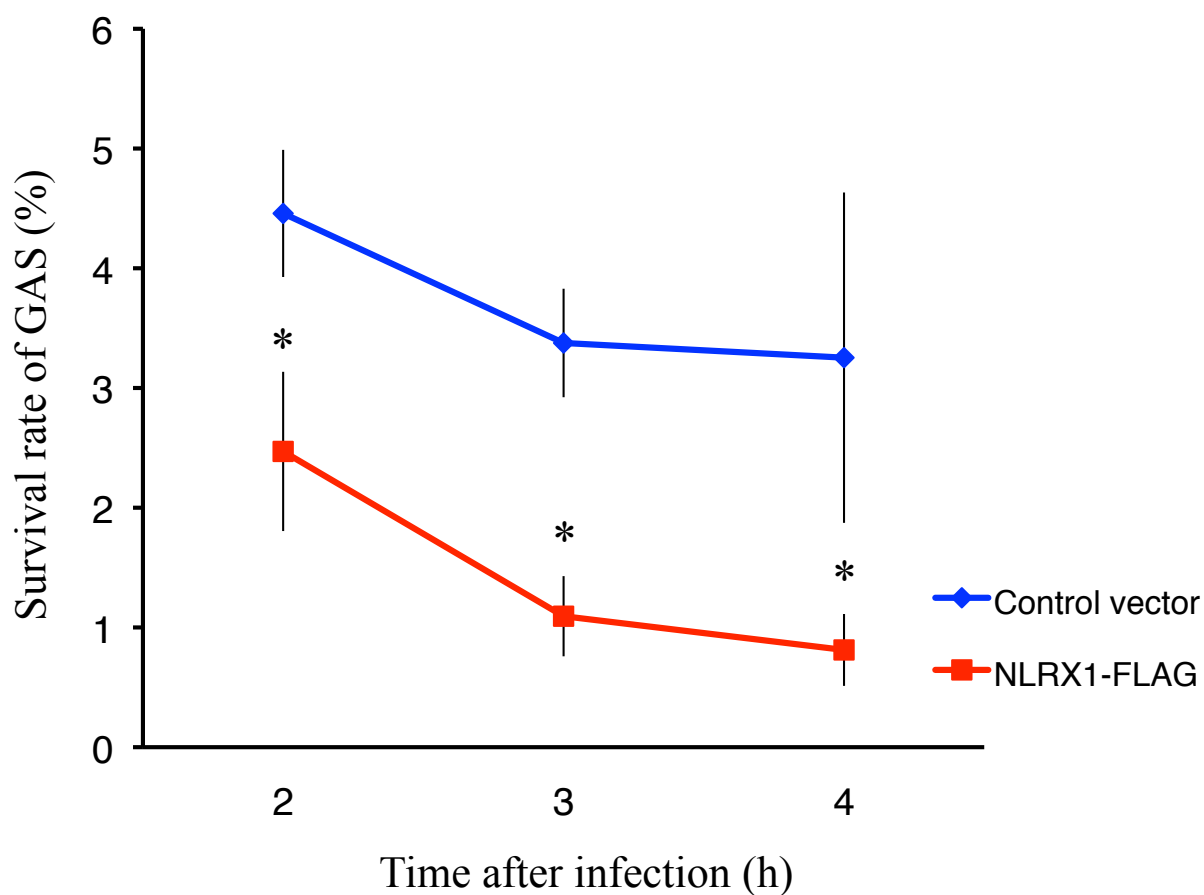
**図24 NLRX1強発現は感染の早い段階でLC3の活性化を誘導する**  
 Control vectorあるいはNLRX1を強発現させたHeLa細胞にGASを感染させた。各感染時間に回収した細胞溶解液を抗LC3抗体を用いたWestern blottingに供した。



**図25 NLRX1強発現によってオートリソソームが効率的に誘導される**

(A) NLRX1を強発現させたHeLa細胞にGASを感染させ、GcLVs (緑)とLAMP1 (赤)の局在を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した.

(B) NLRX1を強発現させたHeLa細胞にGASを感染させた. 各感染時間でのGcLVs と共局在するLAMP1をカウントした. 各々200個以上の細胞をカウントした. 実験は $n = 3$ で行った.  $*P < 0.05$



**図26 NLRX1強発現細胞ではGASの細胞内生存率が減少する**

Control vectorあるいはNLRX1を強発現させたHeLa細胞にGASを感染させた. 感染1時間目に回収された菌を細胞に付着した菌とし, 1時間目の菌数を100%とした時の2時間目以降に回収された菌数を細胞内生存率として示した. 実験はn = 3で行った.\* $P < 0.05$

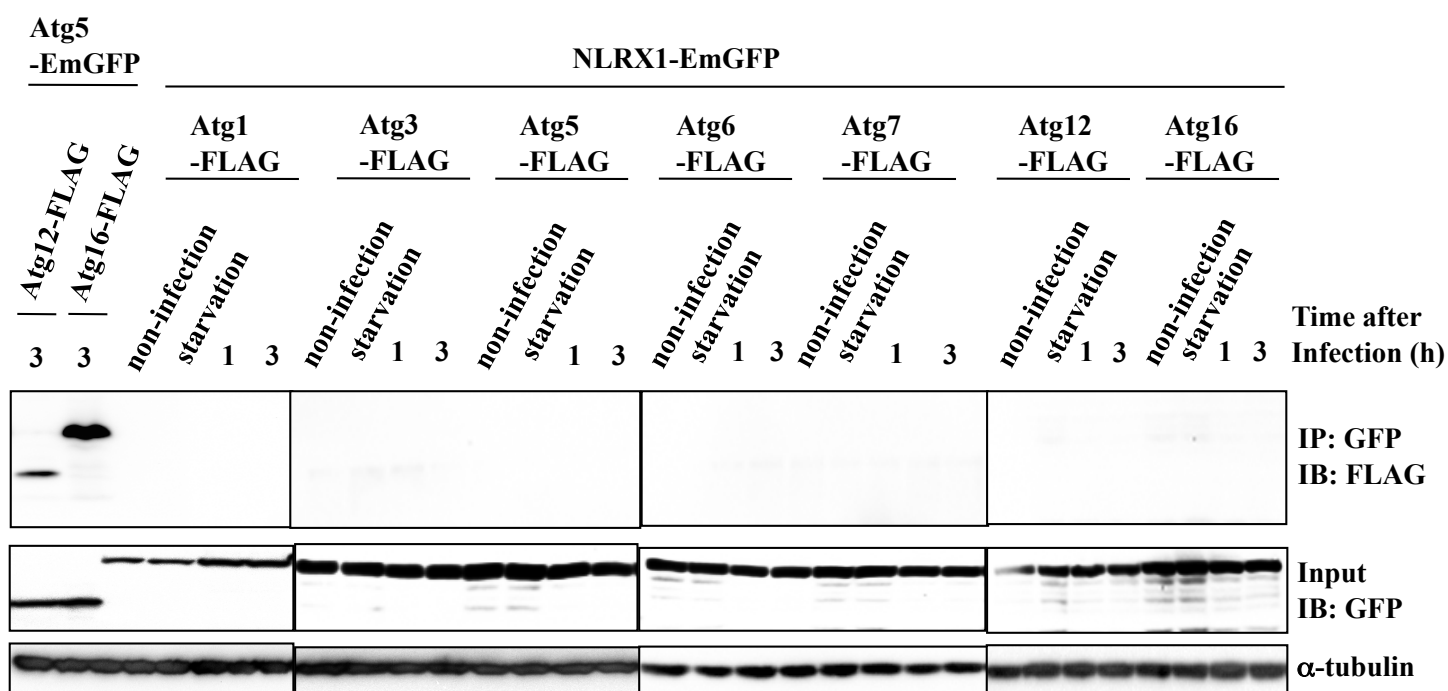


図27 NLRX1とAtgタンパク質は直接相互作用しない

NLRX1-EmGFP及びFLAGタグを持つ種々のAtgタンパク質 (Atg1, 3, 5, 6, 7, 12, 16)を発現させたHeLa 細胞にGASを感染させた. 各感染時間に回収した細胞溶解液を抗GFP抗体で免疫沈降し, Western blotting に供した. 陽性コントロールとしてAtg5とAtg12, Atg5とAtg16の結合を確認した.

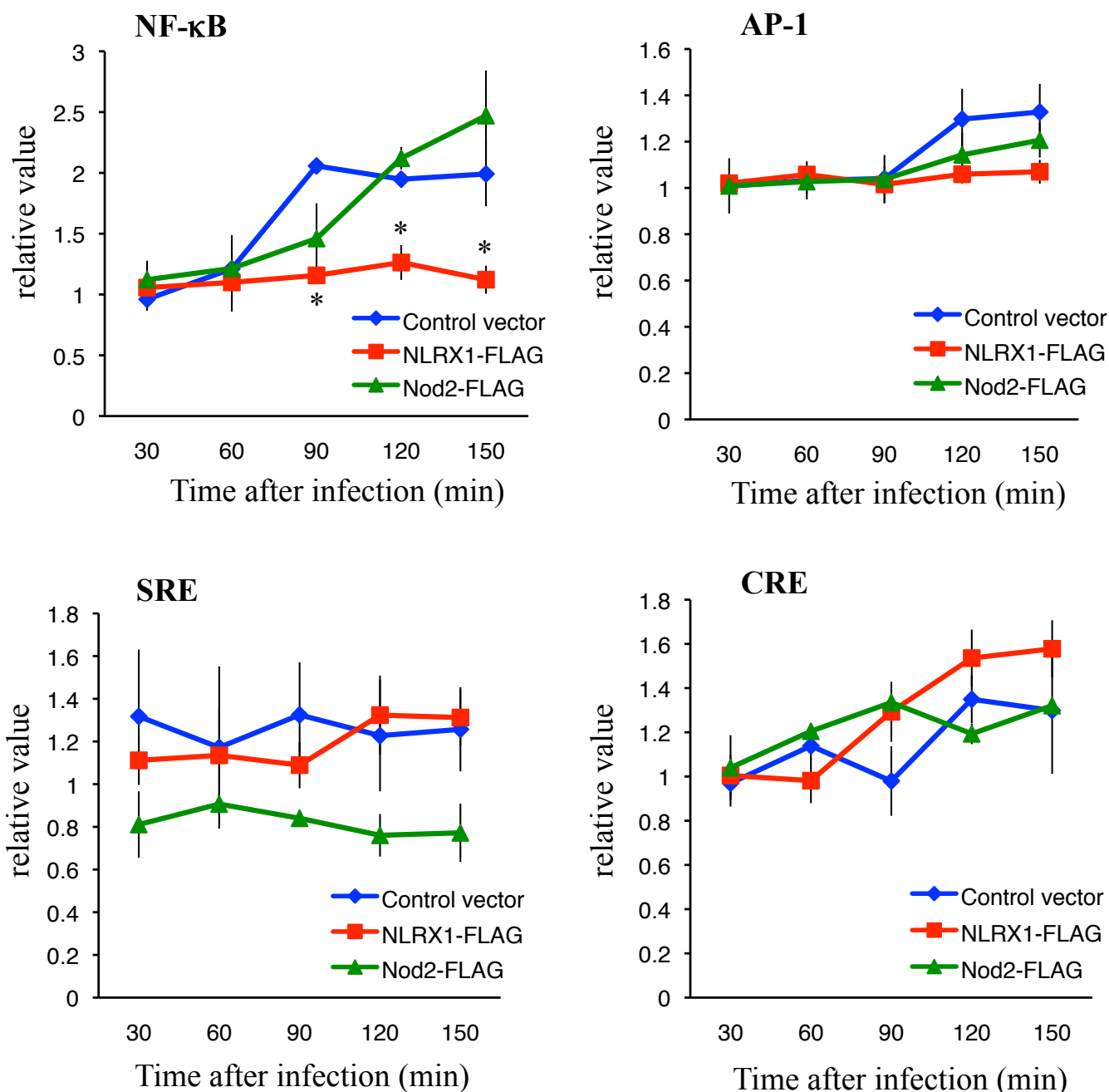
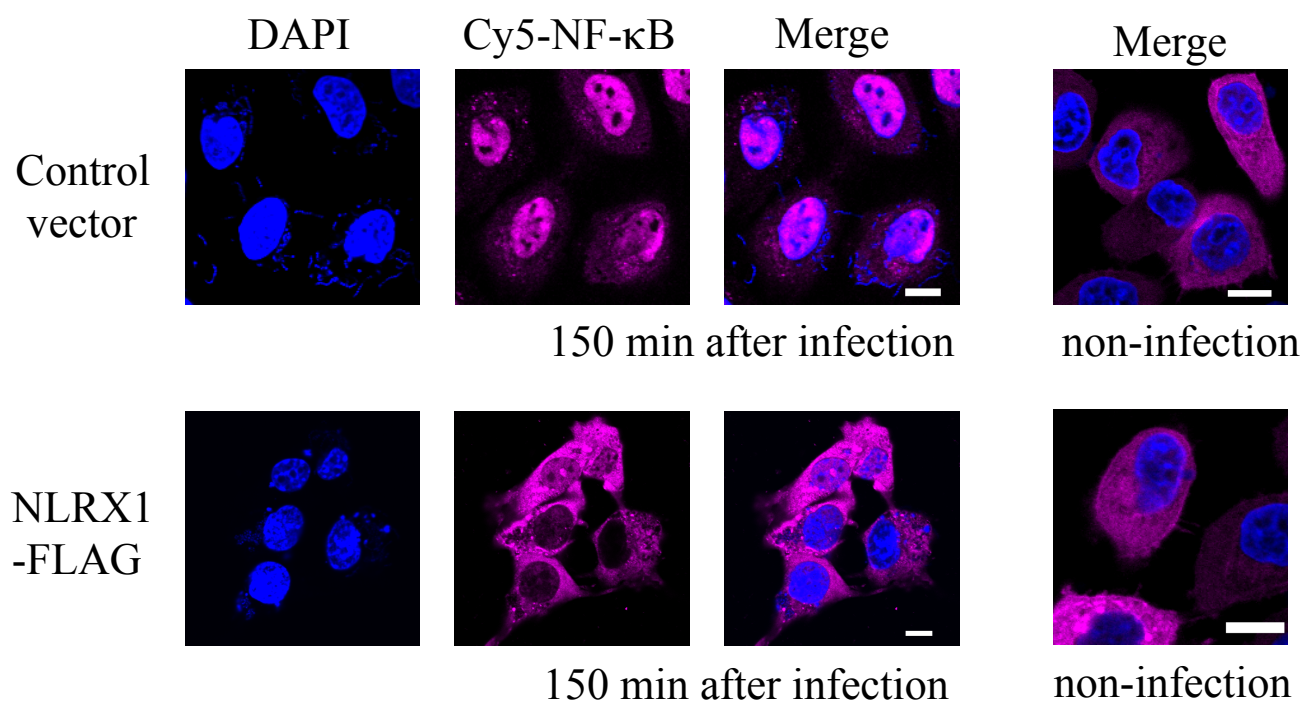


図28 NLRX1の強発現はNF-κBの活性を抑制する

ルシフェラーゼアッセイには、Nuclear factor-kappa B (NF-κB), 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HeLa細胞にGASを感染させ、経時的に細胞溶解液を回収した。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。実験は  $n = 3$  で行った。\* $P < 0.05$

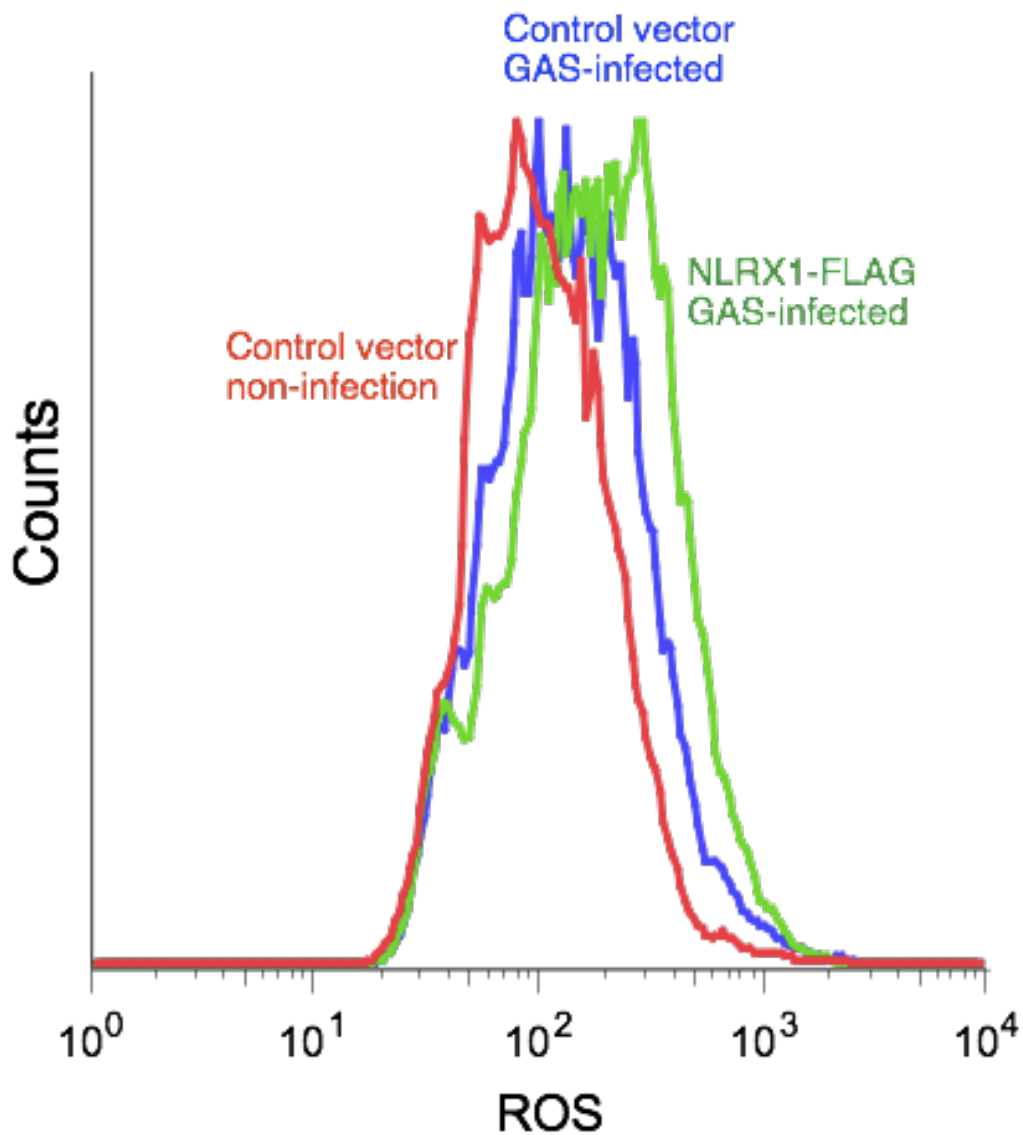




**図29 NLRX1の強発現はNF- $\kappa$ Bの核移行を抑制する**

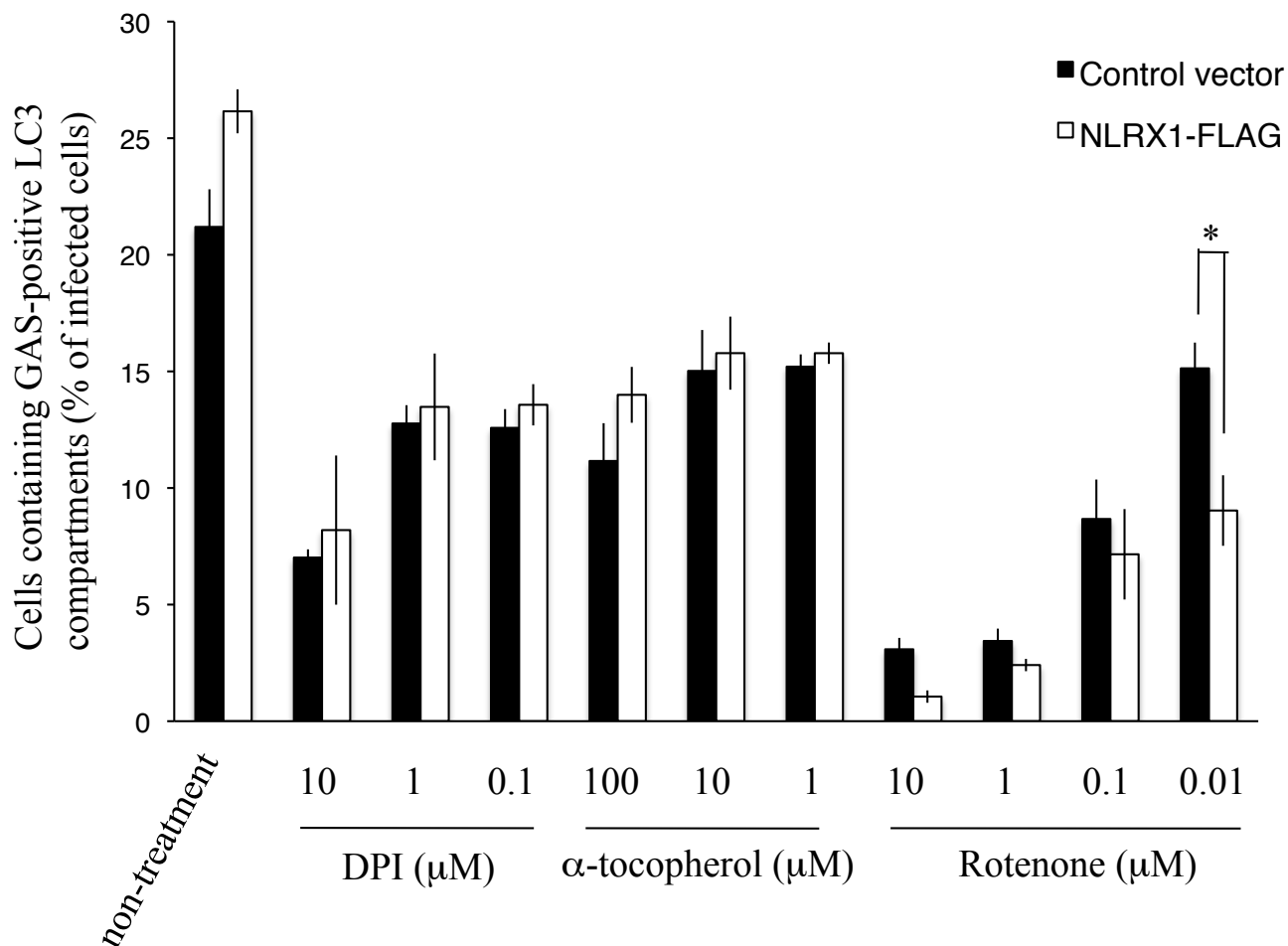
Control vectorあるいはNLRX1を強発現させたHeLa細胞にGASを感染させた. 感染150分後に細胞を固定, NF- $\kappa$ B-Cy5で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて核へ移行するNF- $\kappa$ Bを観察した.

スケールバーは10  $\mu$ m.



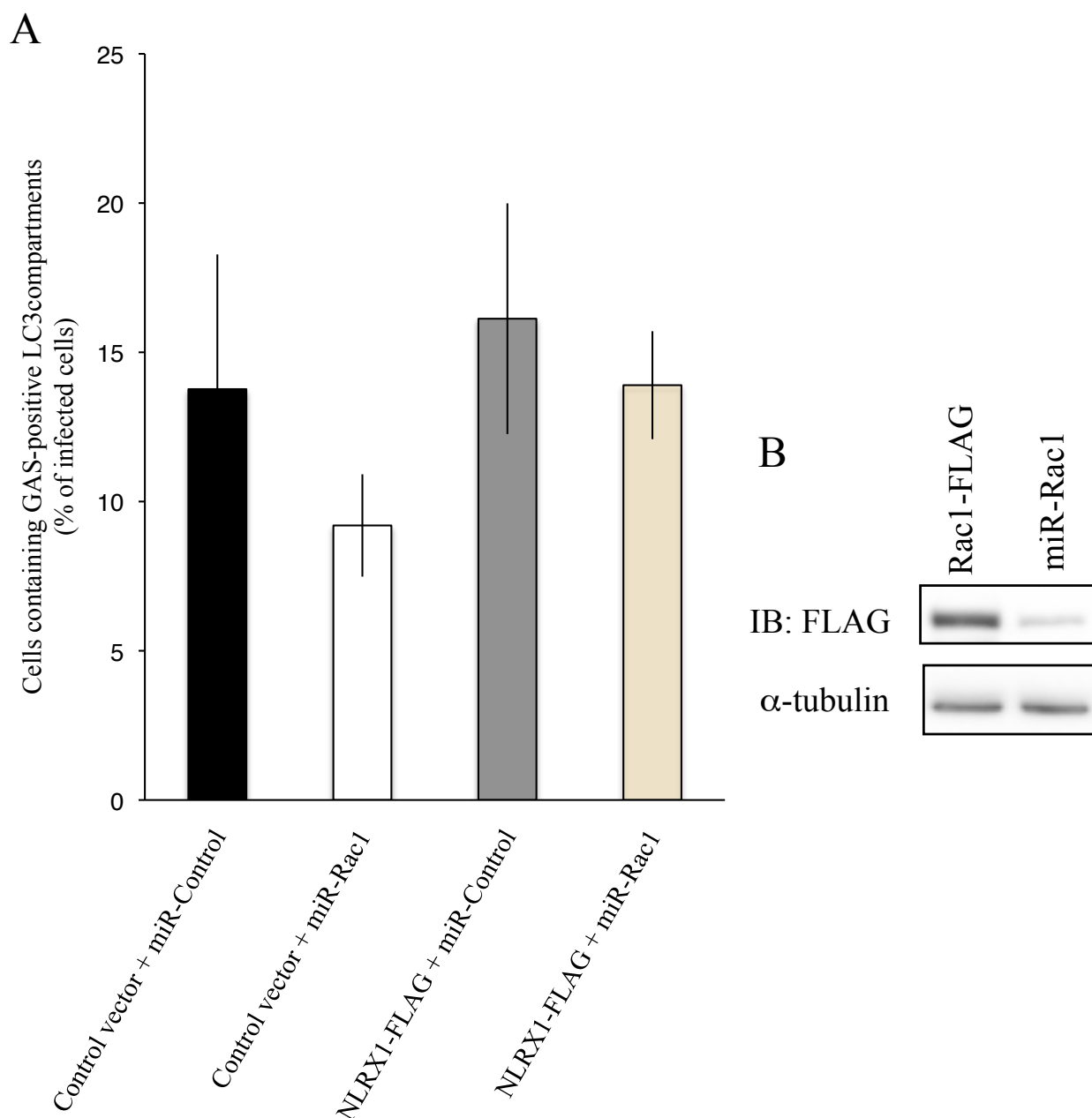
**図30 NLRX1の強発現はROS産生を増加させる**

NLRX1を強発現させたHeLa細胞にGASを感染させた. 回収の30分前にHEを細胞培養液に加え染色した. 感染3時間後に細胞を回収し, FACS解析を行った.



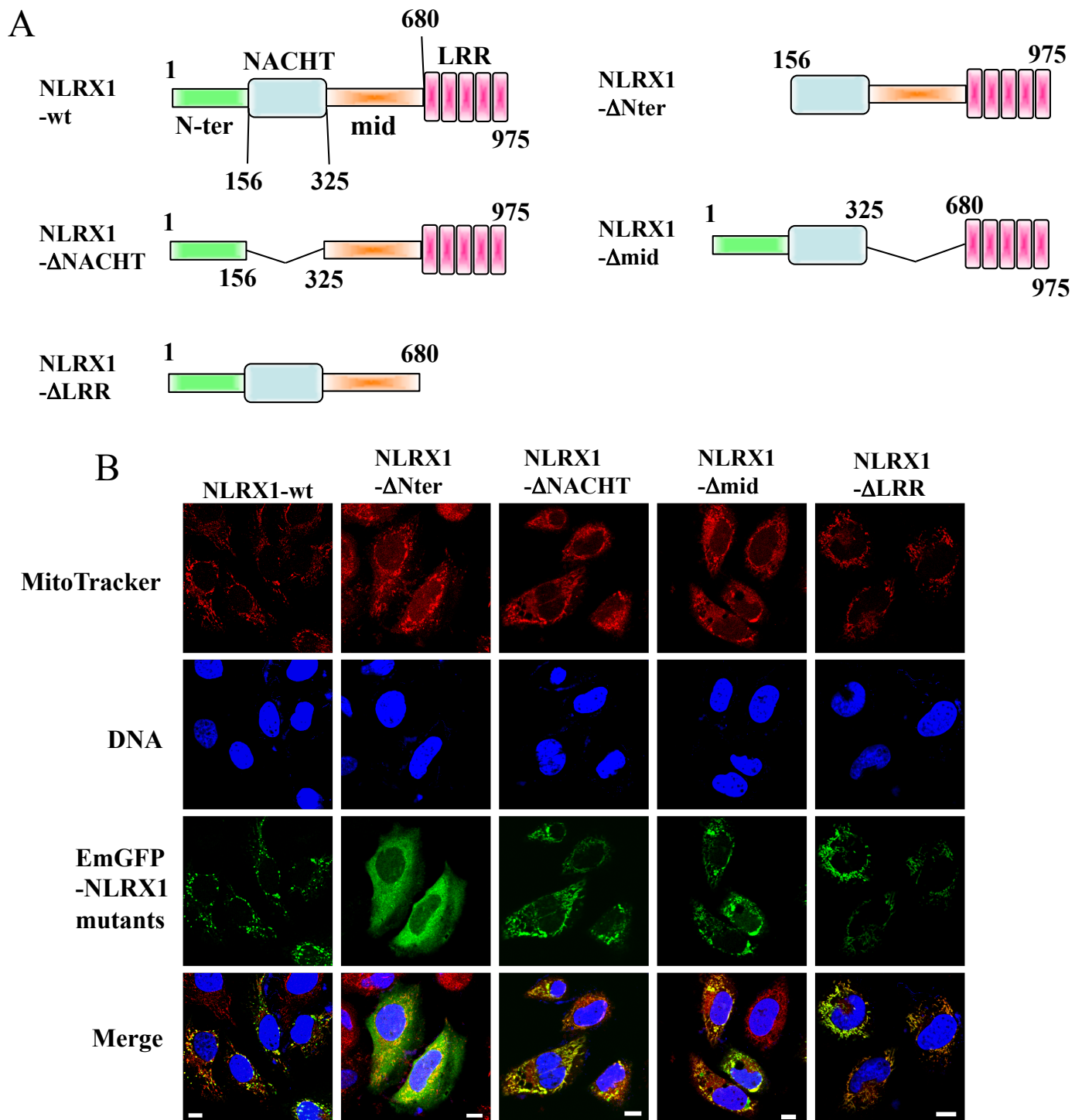
**図31 ROS産生はオートファジーの誘導に必要である**

NLRX1-FLAGを発現させた細胞にGASを感染させ、感染3時間後のGASの細胞内に侵入した細胞におけるGcLVsをカウントした。各々500個以上の細胞をカウントした。抗酸化剤は感染の30分前に培養液に加えた。実験は  $n = 3$  で行った。\* $P < 0.05$



**図32 ROS産生はオートファジーの誘導に必要である**

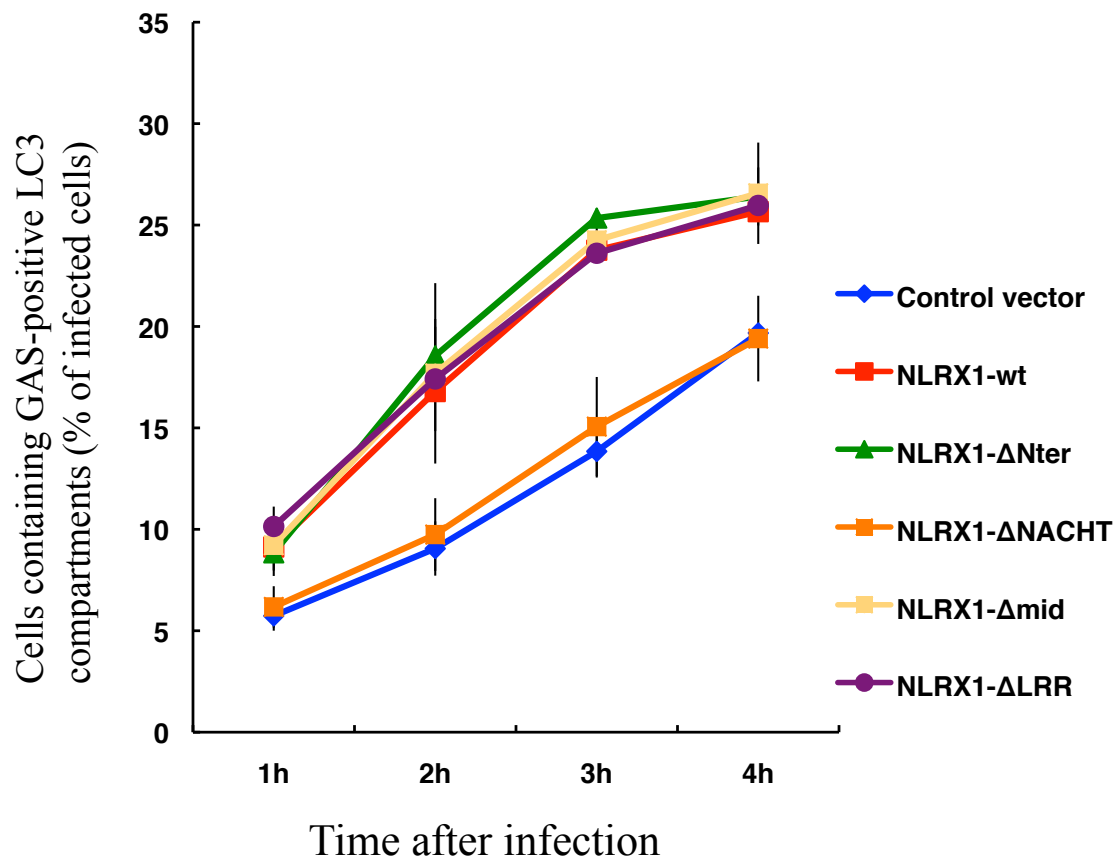
- (A) NLRX1-FLAG及びmiR-Rac1 (Rac1ノックダウン)を共導入した細胞に GASを感染させ, 感染3時間後のGASの細胞内に侵入した細胞におけるGcLVsをカウントした. 各々500個以上の細胞をカウントした. 実験は  $n = 3$  で行った.  $*P < 0.05$
- (B) Rac1の強発現 (Rac1-FLAG)及びノックダウン (miR-NLRX1)を発現させたHeLa細胞の細胞溶解液を抗FLAG抗体によるWestern blottingに供した.



**図33 NLRX1のdomain欠損体の作製**

- (A) NLRX1の各欠損体モチーフ. NLRX1はN terminal (Nter), NACHT, LRRの3つの領域 (domain)によって構成されている. また, 本研究ではNACHTとLRRの間の領域をmidとした. 数字はアミノ酸の数を表す.
- (B) EmGFP結合させたNLRX1の各domain欠損体をHeLa細胞に発現させ, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した. また, 各細胞はミトコンドリアのマーカであるMitoTrackerによって染色した. スケールバーは10  $\mu$ m.





**図34 NLRX1はNACHT domainを介してオートファジーを促進する**

HeLa細胞にEGFP-LC3を導入した. この細胞にさらにNLRX1のdomain欠損体のうち, ΔNter, ΔNACHT, Δmid, ΔLRRを terminal (Nter), NACHT, LRRのいずれかを導入した. これらの細胞にGASを感染させ, 各感染時間でのGASの細胞内に侵入した細胞におけるGcLVsをカウントした. 各々500個以上の細胞をカウントした. 実験は  $n = 3$  で行った.

\* $P < 0.05$

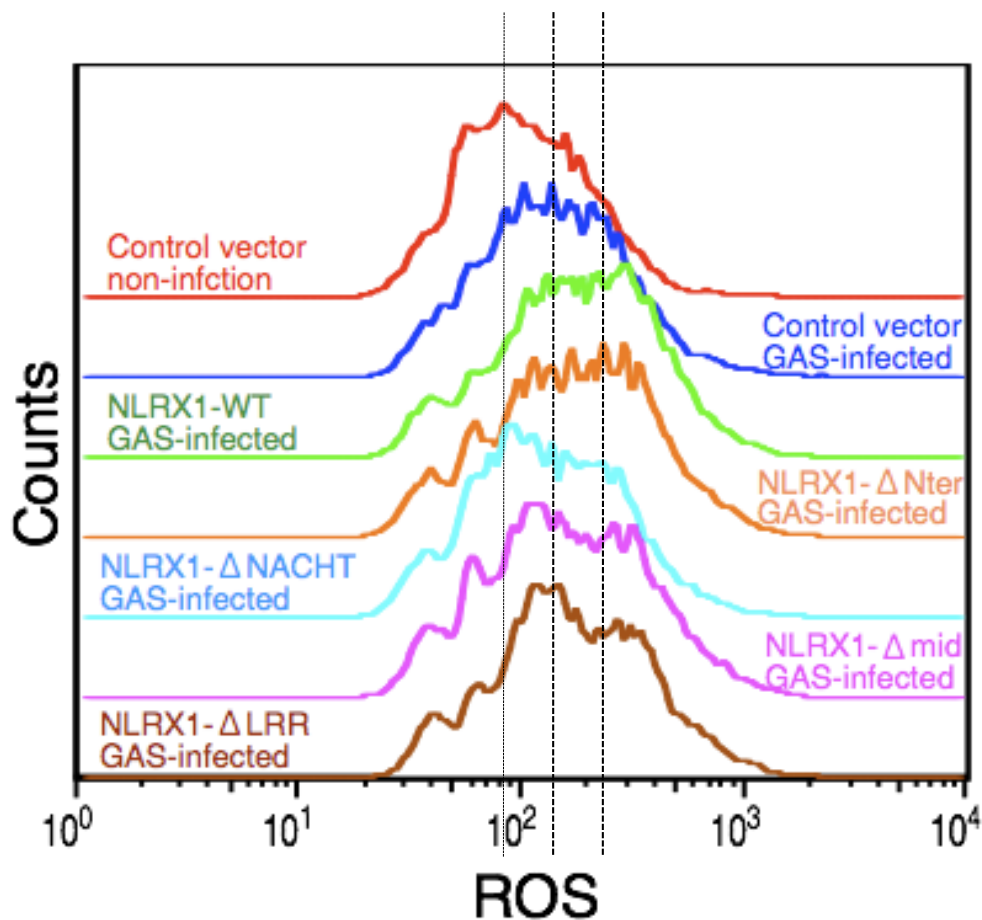
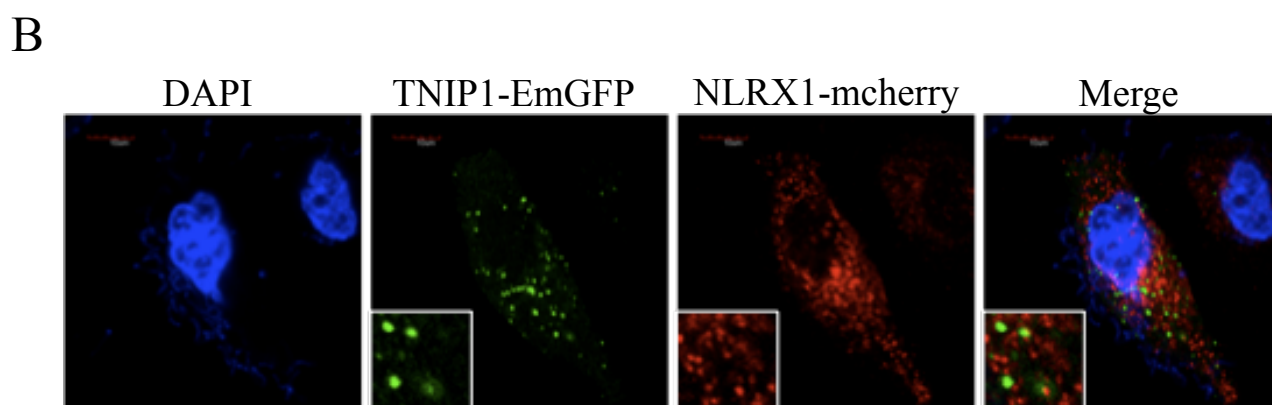
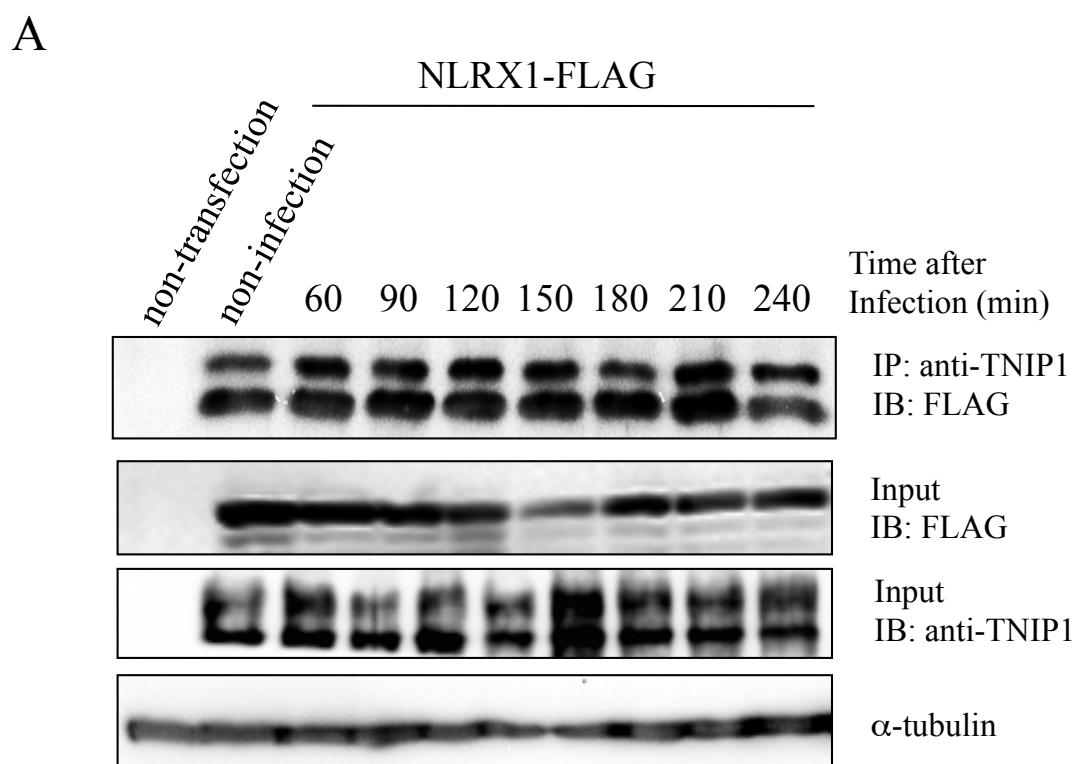


図35 NLRX1はNACHT domainを介してROS産生を増加させる

HeLa細胞にEGFP-LC3を導入した. この細胞にさらにNLRX1のdomain 欠損体のうち,  $\Delta$ Nter,  $\Delta$ NACHT,  $\Delta$ mid,  $\Delta$ LRRを terminal (Nter), NACHT, LRRのいずれかを導入した. これらの細胞にGASを感染させ, 各感染時間でのGASの細胞内に侵入した細胞におけるGcLVsをカウントした. 回収の30分前にHEを細胞培養液に加え染色した. 感染3時間後に細胞を回収し, FACS解析を行った.

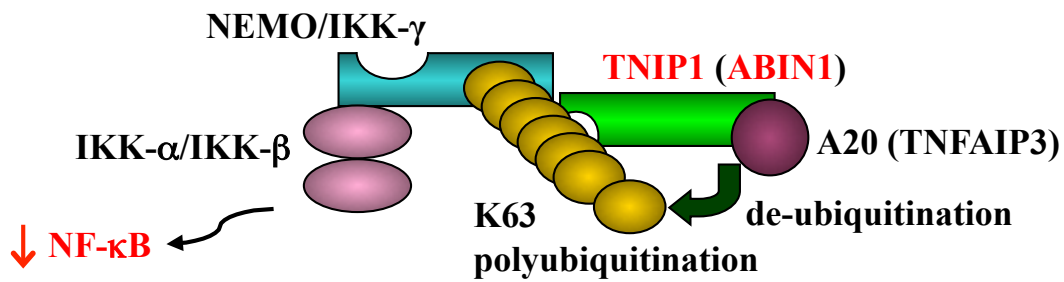


**図36 NLRX1はTNIP1と直接相互作用する**

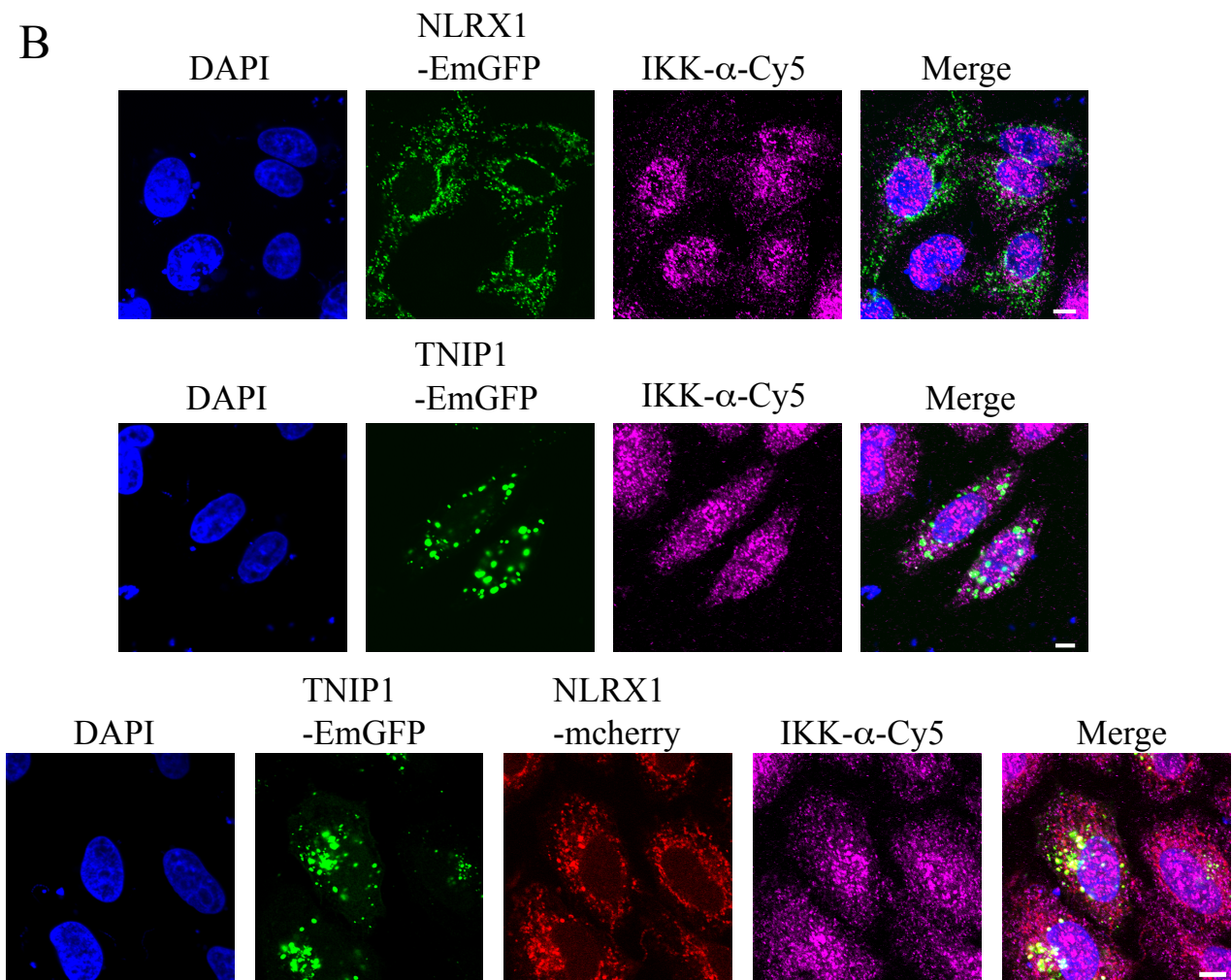
(A) NLRX1-FLAGを発現させたHeLa 細胞にGASを感染させた. 各感染時間に回収した細胞溶解液を抗TNIP1抗体で免疫沈降し, Western blottingに供した.

(B) NLRX1-EmGFP及びTNIP1-mcherryを発現させたHeLa細胞にGASを感染させ, 両者の局在を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した. スケールバーは10  $\mu$ m.

A



B

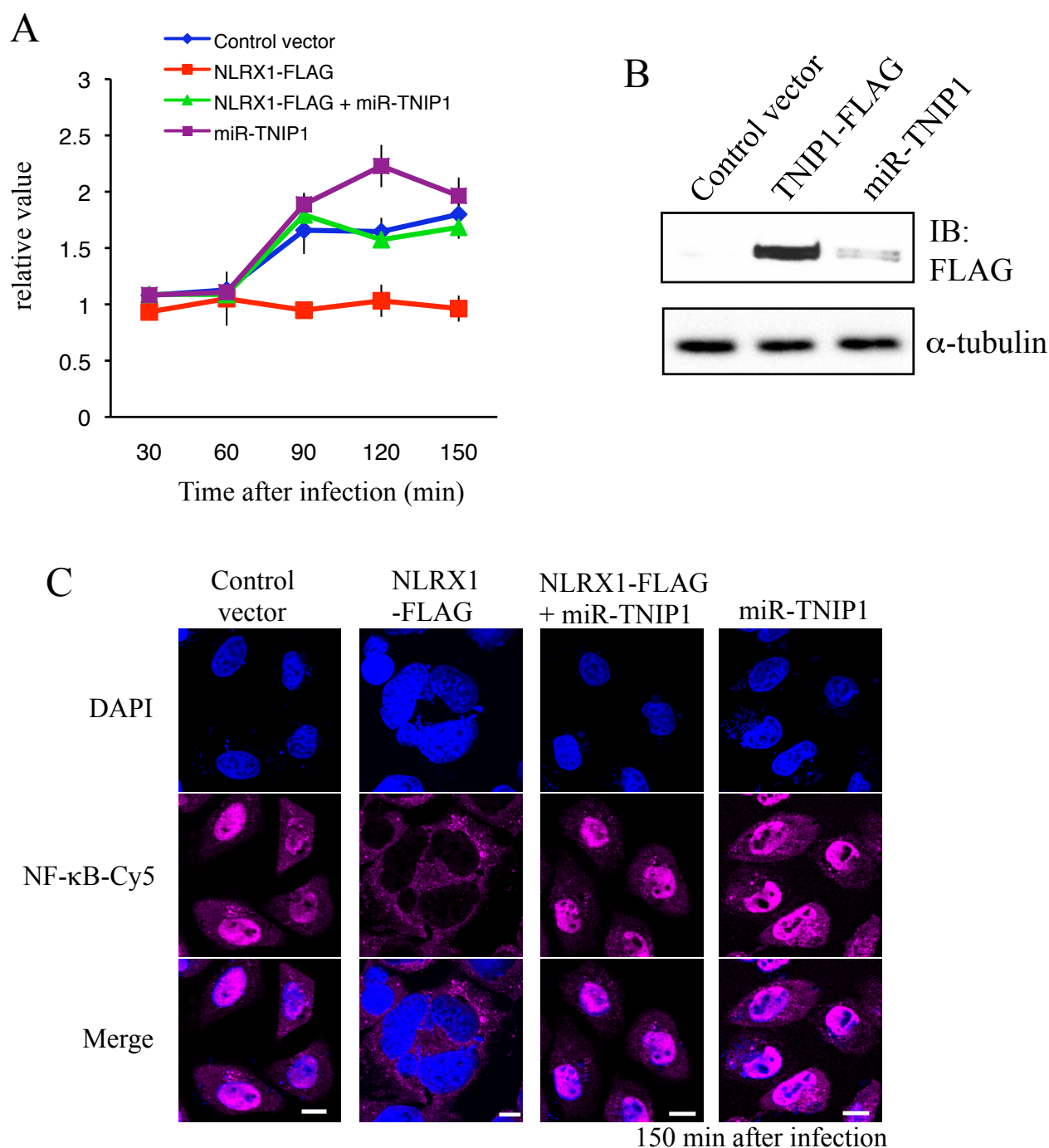


150 min after infection

図37 TNIP1の細胞内局在

(A) TNIP1の細胞内での機能の模式図

(B) NLRX1-EmGFP, -mcherry及びTNIP1-EmGFPを発現させたHeLa細胞にGASを感染させた. 感染150分後に細胞を固定, IKK- $\alpha$ -Cy5で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内でのTNIP1の局在を観察した. スケールバーは10  $\mu$ m.



**図38 TNIP1のノックダウンによってNF-κBの活性は回復する**

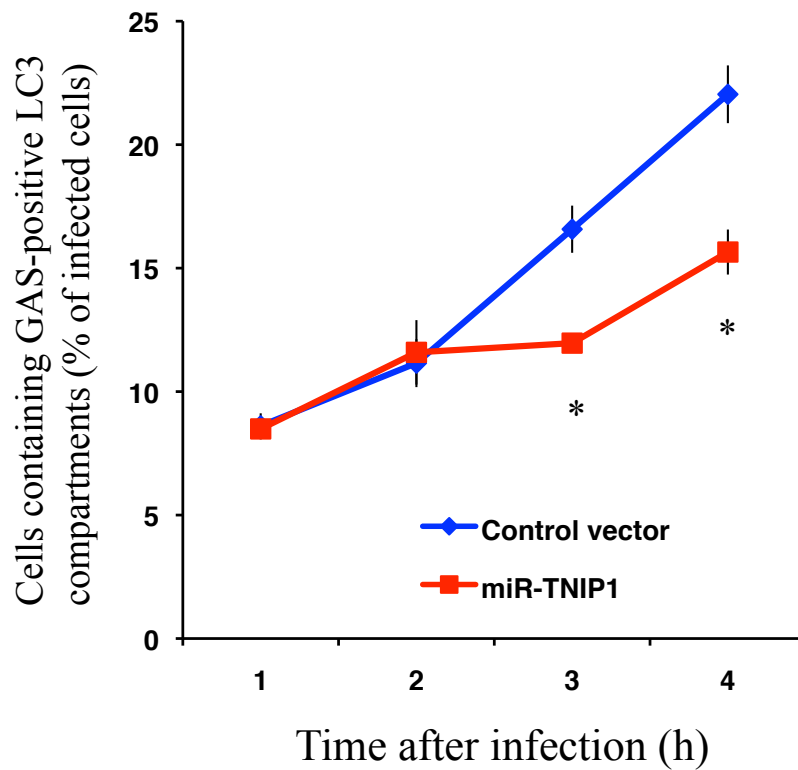
(A) miR-TNIP1あるいはNLRX1を発現させたHeLa細胞にGASを感染させた。

プロモーターアッセイによって、感染後の経時的なNF-κBの活性を観察した。

(B) TNIP1を強発現 (TNIP-1-FLAG)させると同時に、ノックダウンベクター (miR-TNIP1)を導入したHeLa細胞の細胞溶解液を抗FLAG抗体によるWestern blottingに供した。

(C) (A) の条件でそれぞれのベクターHeLa細胞に導入した。感染150分後に細胞を固定、NF-κB-Cy5で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて核へ移行するNF-κBを観察した。スケールバーは10 μm。





**図39 ROS産生はオートファジーの誘導に必要である**

EGFP-LC3及びmiR-TNIP1 (TNIP1ノックダウン)を共導入した細胞に GASを感染させ, GASの細胞内に侵入した細胞におけるGcLVsをカウントした. 各々500個以上の細胞をカウントした. 実験は  $n = 3$  で行った.

\* $P < 0.05$

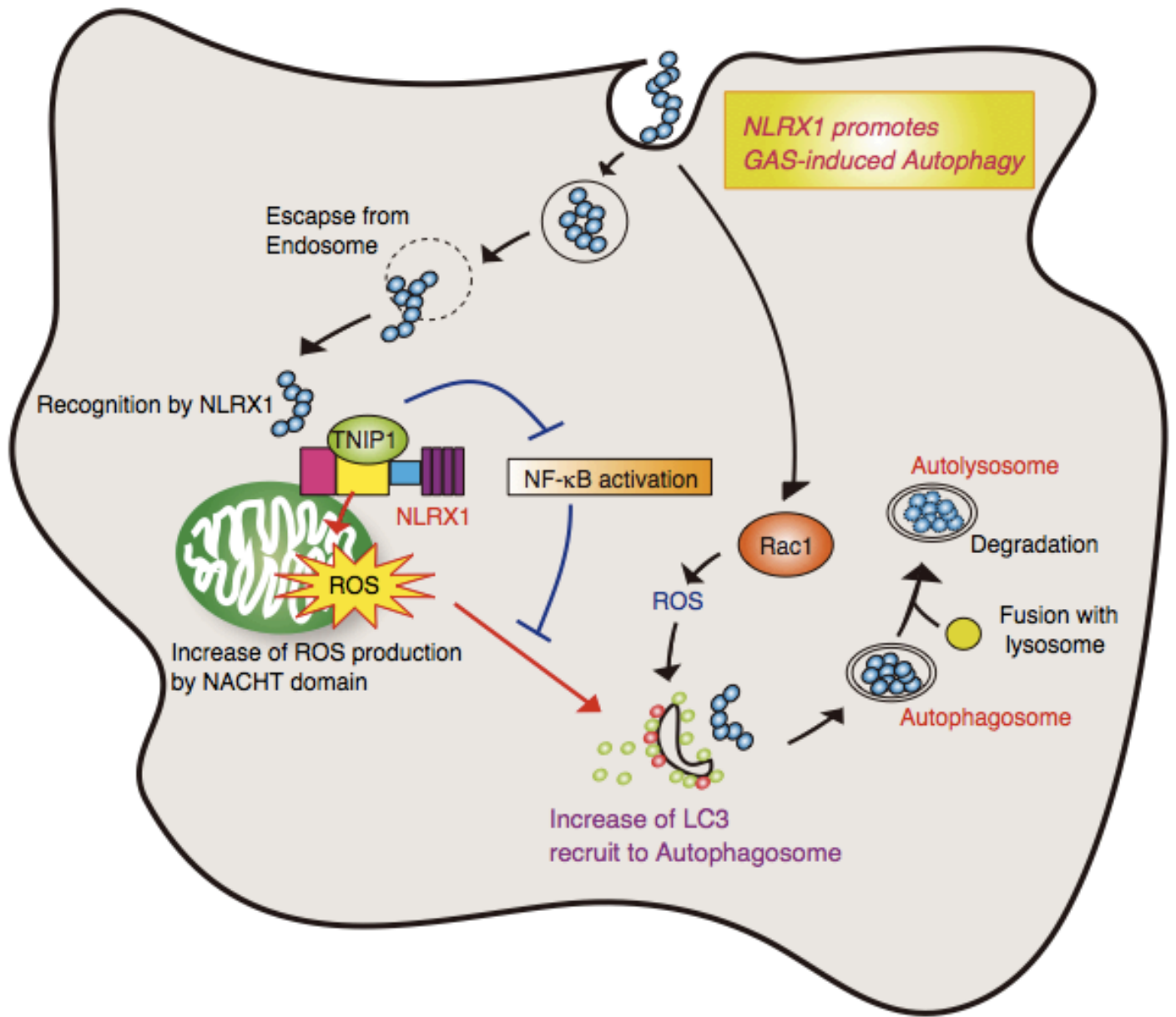


図40 GAS感染上皮細胞におけるNLRX1によるオートファジーの制御機構