

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

研究課題

「たんぱく質と膜が造る細胞内物流システム」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：吉森 保

(大阪大学微生物病研究所 教授)

1 研究実施の概要

真核細胞の内部に存在する膜オルガネラの多く、すなわち小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム、オートファゴソームなどは相互に活発に蛋白質やその他の分子をやりとりし、物流のネットワークを形成している。ネットワークは細胞膜とも接続し、栄養摂取などの細胞のハウスキーピング機能に加え、免疫系や神経系などの生体高次機能をも担

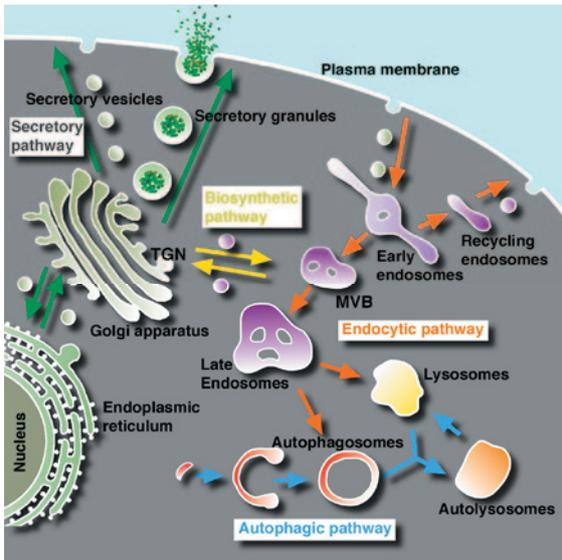


図1 メンブレントラフィックによる細胞内物流ネットワーク

いその破綻は様々な疾患の原因となる。ネットワークにおける輸送は、メンブレントラフィックと呼ばれる複雑でダイナミックな膜の動き一分離、伸長、移動、融合一を介して行われる。そのような膜ダイナミクスは膜と相互作用するたんぱく質群により引き起こされ、かつ厳密に制御されている。たんぱく質の機能解明というポストゲノムにおける焦眉の問題を考えると、たんぱく質による膜ダイナミクス制御の理解は極めて重要な課題である。

メンブレントラフィック研究の進展により、ネットワークに共通の制御たんぱく質が同定される一方で、各経路の膜ダイナミクスの態様と制御機構にかなりの多様性が存在することも明らかになってきた。また各経路が各々独自の役割を持つこともあり、ひとつひとつの経路を丹念に吟味する必要が生じている。本研究では、未だ謎の多い2つの経路、オートファジー経路とエンドサイトーシス経路に焦点を絞り、その分子機構と生理的意義の解明を目指した。5年の期間に分子機構の理解を進めることができ、また生理的意義はプロジェクト開始後感染症を中心とした疾患との関わりに研究が展開し予想外の成果を得た。それについては、平成16年度から細菌学を専門とする天野グループの参加を得たことが大きな助けとなった。

I. オートファジー経路

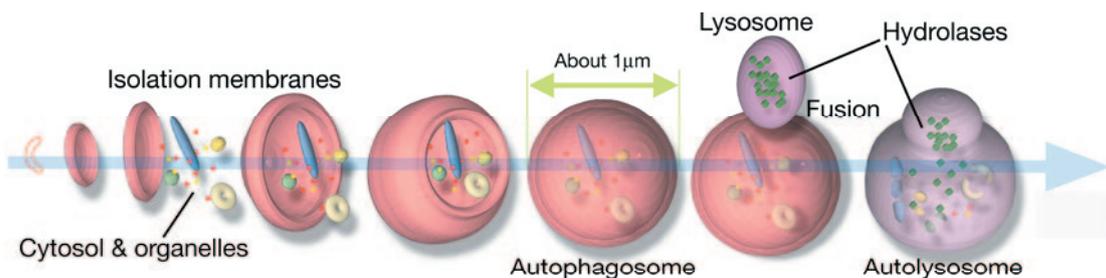


図2 オートファジーの膜動態

オートファジーは、細胞質からリソソームへの物質輸送経路である。細胞質に隔離膜と呼ばれる扁平な袋状膜構造が現れそれが伸張しつつ湾曲し、10分ほどで直径約 $1\mu\text{m}$ の空間の細胞質や他のオルガネラを包み込み、閉じた構造オートファゴソームを形成する。それがリソソームと融合し、内容物はリソソームの消化酵素により分解される。オートファジー研究は発見後の長い停滞期を経て、基礎生物学研究所・大隅良典教授らによる酵母のオートファジー必須遺伝子群 *ATG* の同定がブレイクスルーとなり、ここ数年で劇的な進展を見せている。研究代表者らは、Atg タンパク質の哺乳類ホモログの解析からオートファジーの膜ダイナミクスの実態と分子メカニズムの一部を明らかにし、分野の発展に寄与してきた。本研究では、その実績を活かしさらに分子機構解明を進めると同時に、同定したタンパク質をプローブにオートファジーの新たな役割の追求にも着手した。

対病原体オートファジーの発見 オートファジーの本来の役割は、細胞の自己成分の代謝回転や飢餓時の栄養源確保などの異化作用である。本研究において我々は、細胞内侵入細菌の排除というオートファジーの新たな機能を見いだした。病原性細菌のA群レンサ球菌は非貪食系細胞のエンドサイトーシス経路から侵入し、毒素を用いてエンドソームから細胞質に逃れるが、細胞質に菌が現れると通常の10倍以上の巨大なオートファゴソームが菌を包むように形成され、菌は殺される。オートファジーが代謝のみならず、一種の自然免疫としての役割を持つことが明らかになった。従来選択性は無いと考えられてきたこのシステムが、菌を特異的に感知し隔離する点でも注目される。我々の発見以降、様々な病原体についてオートファジーとの関係が相次いで報告され、ひとつの分野となりつつある。我々の共同研究者は、赤痢菌がオートファジーによる攻撃を免れる機構を持つことを明らかにした。またある種のウイルスが、オートファゴソーム上で増殖するという報告もある。このように、細胞内における病原微生物対オートファジーの攻防というこれまで知られていなかった現象が明るみに出たことで、細胞生物学から免疫・感染症学にまたがる大きな課題が提示されたと言える。我々は、その後引き続きA群レンサ球菌の解析を行い、菌を認識する機構の一端を明らかにすると同時に、巨大オートファゴソーム形成が隔離膜同士融合によること、融合には通常オートファゴソーム形成には不必要なrab7たんぱく質が関与していることを突き止めた。これらの知見は、進化の過程において新たな制御たんぱく質の付加により生体防御に特化したオートファジーが現れたことを示唆する。



図3 A群レンサ球菌を包み込もうとしているオートファゴソーム

オートファジーによる変性疾患原因たんぱく質の分解 遺伝子の変異などにより正しい立体構造がとれなくなったたんぱく質は、しばしば細胞内で凝集・蓄積し細胞死をもたらす。その結果、アルツハイマー病や狂牛病などの変性疾患が引き起こされる。我々は、肝変性疾患の原因となる $\alpha 1$ -アンチトリプシンZ変異体(ATZ)がオートファジーによ

って特異的に分解されることを見いだした。ATZ はプロテアソームによって分解されることが既に知られているが、オートファジーによる分解量はそれに匹敵する。オートファジーは、凝集塊ではなく凝集前の ATZ を隔離・分解していた。さらに我々は、ハンチントン舞踏病などの神経変性疾患の原因となる長いポリグルタミン鎖を含むたんぱく質 (polyQ) の凝集塊形成や毒性をオートファジーが抑制することも示した。PolyQ を細胞内に注入すると、数分以内にオートファジーを誘導するが、病気を起こさない短いポリグルタミンは何も起こさない。この場合も、オートファゴソームは凝集前の PolyQ を分解していた。近年、凝集塊はむしろ細胞にとっては無害で、凝集前段階の状態が毒性を持つという仮説が提唱されている。もしそれが正しいなら、オートファジーがそのような段階で PolyQ を認識し分解することは合理的といえよう。PolyQ がプロテアソーム活性を阻害するという報告もあり、オートファジーが神経変性疾患の抑制に果たす役割は予想以上に大きいかもしれない。以上オートファジーは、病原微生物や異常たんぱく質という細胞にとっての「招かれざる客」を排除する生体防御システムとして働いていることが本研究により判明した。

オートファジーの分子機構 Atg たんぱく質が同定されたことにより、オートファジーの分子メカニズムの解明は著しく進んだが、各 Atg の機能などは不明で未だ全容は明らかではない。本研究により、その理解に複数の重要な進展があった。まず、オートファゴソームが完成後微小管に沿ってダイニンモーターを使って移動することを示した。移動は、オートファゴソームに結合している Atg8 ホモログの LC3 たんぱく質に対する抗体の顕微注入で阻害されたので、LC3 が移動に関与している可能性がある。この阻害効果を利用して、細胞の辺縁部で形成されたオートファゴソームが、核近傍に分布するリソソームと融合するために移動が必要であることを証明した。次に、Atg6 ホモログのベクリンについて、新規の結合たんぱく質を2種同定した。それらの解析からベクリンがオートファジーとエンドソーム系それぞれで機能する2種類の複合体を形成することが判明した。さらに、これまで機能未知であった Atg5-Atg12-Atg16L 複合体が、オートファゴソーム形成に必要な LC3 の翻訳後修飾 (ユビキチン化に類似した脂質化) の最終段階を触媒することを明らかにした。このたんぱく質複合体は、膜を基質とするユニークな E3 酵素として LC3 をオートファゴソーム膜の元となる膜構造に導き脂質化を行う。また、GFP と mRFP のふたつの蛍光たんぱく質を LC3 に繋ぐことで、オートファゴソームがリソソームと融合しているかどうかを識別できるプローブを開発した。オートファジーの進行をモニターするアッセイ系として有用である。

II. エンドサイトーシス経路

エンドサイトーシス経路は、オートファジーと比較すると解析が進んでいるが、まだ不明な点も多い。本研究では、この経路を利用した歯周病菌の細胞内侵入機構と、本経路における被輸送たんぱく質の選別機構に関し新たな知見を得た。

歯周病菌の細胞内侵入機構 人類史上最も患者数の多い慢性疾患である歯周病の原因菌 *P. gingivalis* の細胞内侵入機構の詳細を明らかにした。*P. gingivalis* の細胞内

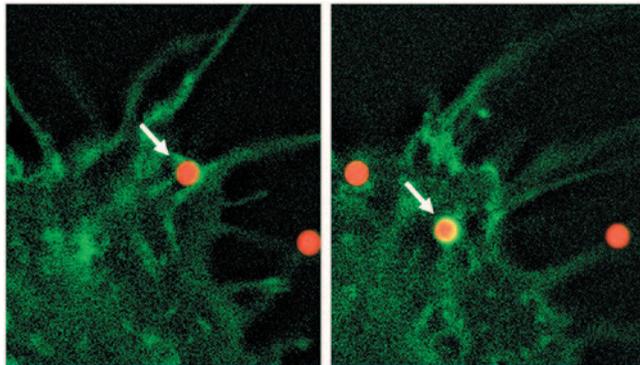


図4 歯周病菌成分をコートしたビーズ(赤)の細胞内侵入。緑は Raft マーカー。

侵入は、細胞膜の特異微小領域 Lipid Raft に依存しておこっていた。さらに、本菌が微小管、アクチオン系の重合・脱重合を利用し細胞内侵入を果たすことを発見した。これまで微小管はオルガネラなどの移動の「レール」として機能することは知られていたが、微小管の重合・脱重合というダイナミクスが細胞内細菌の侵入に関わるという知

見は無かった。また、本菌の細胞侵入効率を決定する要因として線毛遺伝子多型が重要であることを示した。特定の型の線毛遺伝子をもつ菌株は顕著な細胞侵入能を発揮し、歯周細胞に侵入した後、細胞内シグナル分子を分解し、強力な細胞機能障害と細胞死を引き起こし、歯周組織の破壊を促進させていると考えられた。

エンドソームにおける受容体のユビキチン化 エンドサイトーシス経路では、ユビキチン化がリソソームへの輸送の信号でその識別はエンドソームで行われる。上皮成長因子受容体 (EGFR) は細胞膜でユビキチン化され、それによりエンドソームで選別されると考えられていたが、我々はエンドソームへの輸送過程でも常にユビキチン化は起こっており、それが阻害されるとただちに脱ユビキチン化が起こりリソソームに運ばれなくなることを見いだした。EGFR ユビキチン化の E2 酵素も新たに発見した。これらの実験結果に基づき、リソソームへの選別の機構に関する新しいモデルを提案している。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

真核生物の細胞内部には、多くのオルガネラを結ぶ物流のネットワークが存在する。ネットワークは細胞膜とも接続し、栄養摂取などの個々の細胞の生存に必要な機能に加え、免疫系や神経系などの生体高次機能も担いその破綻は様々な疾患の原因となる。ネットワークにおける輸送は、多数のたんぱく質によって制御されたメンブレントラフィックと呼ばれる複雑でダイナミックな膜の動きを介して行われる。たんぱく質による膜ダイナミクス制御の理解はポストゲノムの重要課題であると考えられる。

ネットワーク内の各経路の膜ダイナミクスの態様、制御機構、役割は多様である。本研究では、未だ謎の多い2つの経路、オートファジー経路とエンドサイトーシス経路に焦点を絞り、その分子機構と生理的意義の解明を目指した。我々が既に同定していたこれらの経路の制御たんぱく質複数を手がかりに、膜ダイナミクスの実態と分子機構のさらなる解析を進め、またこれらの膜ダイナミクスの役割がより重要となっている哺乳類におけるその生理的意義を追求する計画を策定した。生細胞中でのたんぱく質可視化技術の発達が膜ダイナミクス研究に転機をもたらしており、本研究でも可視化を技術的な柱のひとつとした。その他、分子細胞生物学や生化学の様々な手法を駆使し、多面的なアプローチを展開することを考えた。

生理的意義については、計画当初は発生・分化等との関連において捉えることを予定していたが、研究開始後オートファジーによる細胞内侵入病原細菌の排除という予想外の新発見があったことから、感染症をはじめとした疾患との関わりを重点課題とすることに方針を転換した。吉森グループ単独で始まった研究実施体制も、方針転換に伴いこの新発見における共同研究者であり細菌学の専門家である天野グループに中途(平成16年度)から参加してもらった。分子機構についても、当初計画に加え、本研究実施中に見いだした新たな機能におけるメカニズムや、感染症に注目して新規に設定した課題(歯周病菌の細胞内侵入メカニズム)の研究も行い成果を上げた。

役割分担

吉森グループ

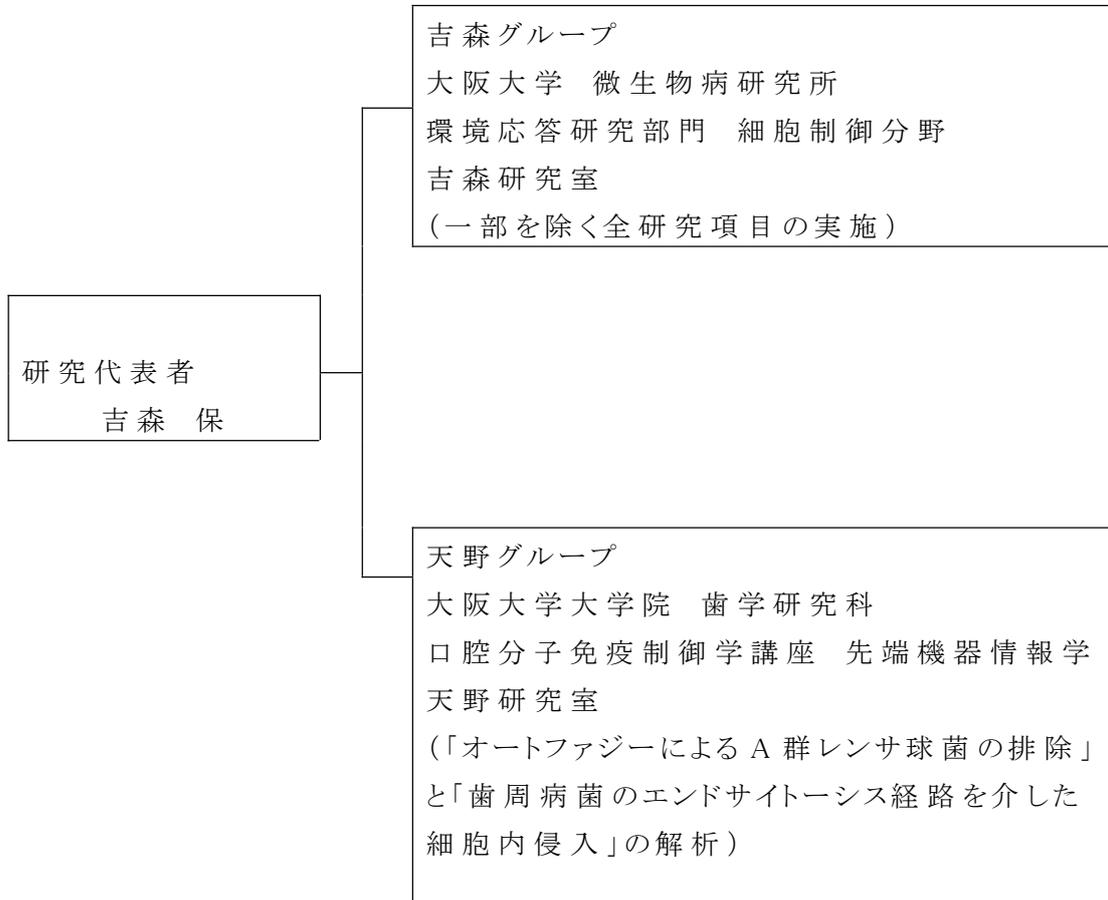
本研究計画の主たる遂行グループであり、ほぼ全ての研究をこのグループが実施した。「オートファジーによるA群レンサ球菌の排除の研究」については天野グループのサポートを受けた。また「歯周病菌のエンドサイトーシス経路を介した細胞内侵入機構の解析」は天野グループの主導下に行った。

天野グループ

「オートファジーによるA群レンサ球菌の排除の研究」について、細菌学的側面を全面的にサポートした。またA群レンサ球菌の認識に関与する細菌側及び宿主側因子の同定と機能解析を行った。「歯周病菌のエンドサイトーシス経路を介し

た細胞内侵入機構の解析」を主導した。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 たんぱく質と膜が造る細胞内物流システムの解析

(大阪大学 吉森グループ)

(1)研究実施内容及び成果

(1)-1 対病原体オートファジー

生体内に入った細菌の多くは、好中球やマクロファージなどの貪食細胞に取り込まれ、そのエンドサイトーシス経路で殺菌・消化される。一方、上皮などの非貪食細胞のエンドサイトーシス経路にもしばしば菌は入る。それは、上皮バリアーの突破のためあるいは貪食細胞や免疫系から逃れるために細胞内に積極的に入ろうとしていると言われていたが、逆に細胞に喰われているとも取れる。実際、侵入した菌はエンドサイトーシス経路に入りリソソームで分解される場合が多いようなので、非貪食細胞による食菌とみなすこともできる。菌がエンドサイトーシス経路を突破して細胞質に侵入した場合には、その菌を殺すわけではないと言われていたが、本研究で我々は、オートファジーが細胞質における免疫システムとして侵入菌に対抗している事実を明らかにした。

(1)-1-1 オートファジーによる細胞内侵入 A 群レンサ球菌の排除

A群レンサ球菌(溶連菌)は、咽頭炎、膿痂疹(とびひ)、リウマチ熱などの原因となる極めて一般的な病原性細菌であるが、希には壊死性筋膜炎などの高致死率の劇症型感染症を引き起こすので「人喰いバクテリア」とも呼ばれ恐れられている。この菌も、他の多くの細菌同様、宿主の上皮細胞などの内部に「侵入」する。しかし細胞内に入ったA群レンサ球菌の運命や、細胞内侵入の病理的な意義(菌と宿主のどちらに好都合なのか)は不明であった。本研究において我々はその点を検討するため、HeLa 細胞や線維芽細胞などの培養細胞に本菌を感染させ解析した。その結果まずこの菌が、溶血毒素streptolysin Oを分泌しその作用でエンドソームを破壊し細胞質に現れることを見いだした。streptolysin Oを作れない変異株はエンドソームに留まった。このような細胞質への脱出は、貪食細胞に喰われたある種の菌でも知られていてエンドサイトーシス経路における分解を逃れるためと考えられる。A群レンサ球菌も同じ戦略を採用したと思われるが、細胞質に現れるとオートファゴソーム結合たんぱく質のLC3にGFPを融合したものに包み込まれることが蛍光顕微鏡観察で判明した。これはLC3が直接菌に結合したためではなく、LC3が分布する膜構造が菌の集団を囲い込んでいることを免疫電子顕微鏡法で確認した。感染後5時間で、侵入菌の80%が囲い込まれた。菌を囲い込んだ膜構造は、2重ないし多重の膜からなり内部に無傷の細胞質を含むオートファゴソームや、リソソームとの融合により1重膜となり内部に消化の進んだ細胞質を持つオートリソソームの特徴を持つことを確認できたが、非常にサイズが大きい点が特異であった。通常オー

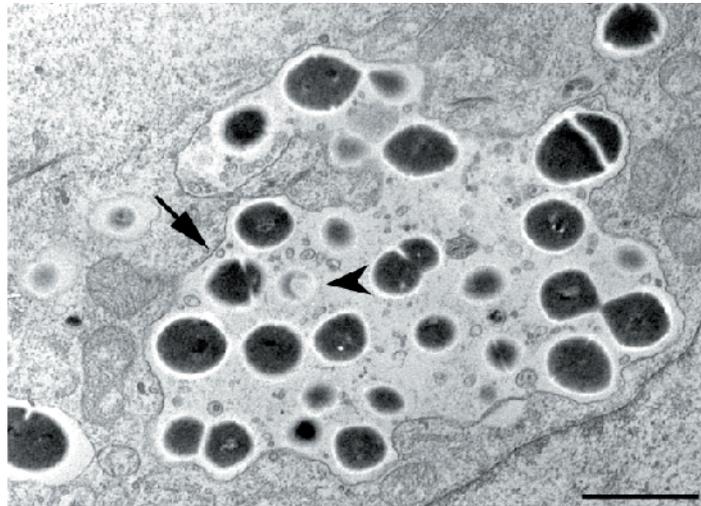
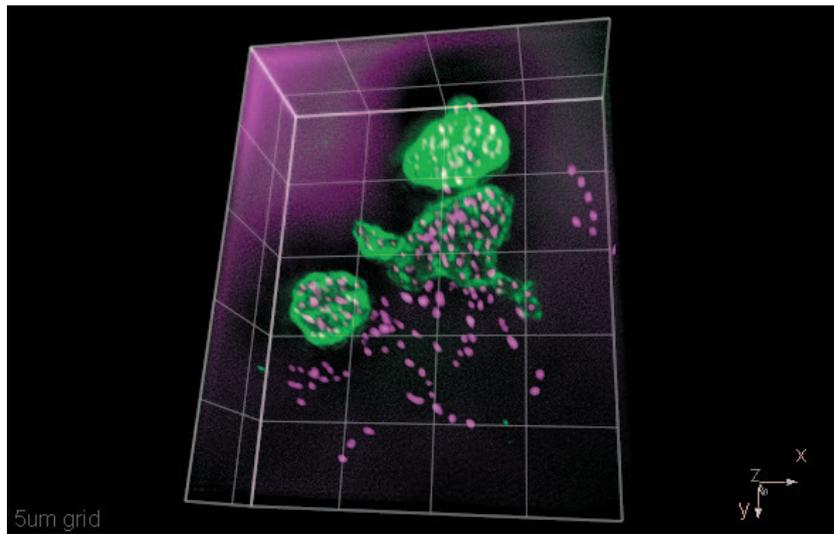


図1 上:A群レンサ球菌(赤紫)のクラスターを包み込む巨大オートファゴソーム(緑:GFP-LC3で標識)の蛍光顕微鏡3Dイメージ。グリッドは $5\mu\text{m}$ 。下:菌を取り込んだオートリソソームの電子顕微鏡イメージ。内部の細胞質や菌の消化が始まっている。バーは $1\mu\text{m}$ 。

トファゴソームの直径は約 $1\mu\text{m}$ であるのに対し、菌を包む構造はその10倍以上になることもあった。また通常の富栄養の培養条件下ではオートファジーは基底レベルにあってオートファゴソームはほとんど見あたらず(他のオルガネラと異なり、オートファゴソームは一過性に現れて数十分で消える)、飢餓などで誘導がかかると始めてオートファゴソームが増加するのだが、A群レンサ球菌が侵入すると、飢餓ではないにもかかわらずオートファジーが誘導される。先述のストレプトリシンO欠損菌株では、誘導も包み込みも起こらないので、菌が細胞質に現れることが引き金になっているものと思われる。そして細胞質に菌が現れると、あたかも菌を狙うかのようにオートファゴソームが多数形成され、若干の細胞質も含むものの大部分が菌のみの内容を持つ巨大オートファゴソームが出現する。従来オートファジーは非選択的であり、細胞質の一部を無作為に分解すると考えられていたので、この点は極めて興味深い。

次に、オートファゴソーム形成に必須の Atg5 たんぱく質の遺伝子を破壊した細胞に、

本菌を感染した。すると LC3 が結合した膜による菌の包み込みは皆無となった。LC3 は I 型と II 型の 2 つのフォームがあり、細胞質に分布する前者が翻訳後修飾で後者に転換されオートファゴソーム膜に局在化する。この LC3-II の量はオートファゴソーム形成に比例しており、正常細胞への本菌の感染によりその増加が認められる一方、Atg5 ノックアウト細胞では全く LC3-II は検出されなかった。以上の結果から、菌の包み込みは通常のオートファジー同様 Atg5 に依存的であると結論した。続いて細胞内に侵入後に生存している菌数を、コロニー形成法で経時的に測定した。すると生きている菌の数は、感染後 5 時間で約 20% 程度に減少した。菌の細胞外への脱出を阻害するタンニン酸処理でもそれは変わらないので、感染した菌は細胞内で死んでいくものと思われた。オート

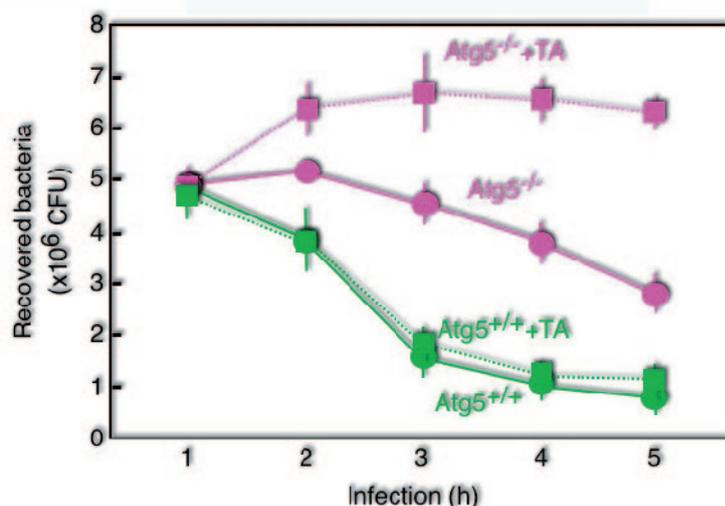


図 2 オートファジーによる菌の死滅
縦軸は細胞内の生菌数。横軸は感染後の時間。TA はタンニン酸処理。

ファゴソームを形成できない Atg5 ノックアウト細胞の場合は、生菌数減少は顕著に抑制された。しかもタンニン酸処理では逆に菌は増加した。この結果は、正常細胞では A 群レンサ球菌は 5 時間以内に大部分が死滅し、その死滅はほぼ全てオートファジーによるものであること、オートファジー不能の状態では菌は増殖し、一部は細胞外に出ていくことを強く示唆している。通常のオートファジーでは、オートファゴソームとリソソームが融合し、前者が取り込んだ細胞質やオルガネラが消化される。リソソームマーカーが徐々に菌を捕獲したオートファゴソームに現れ、またリソソーム消化酵素阻害剤で殺菌が阻害されたことから、A 群レンサ球菌の死も、菌を捕獲したオートファゴソームにリソソームが融合して流れ込んだ消化酵素の作用によると結論した。

以前にもオートファゴソームらしき構造内に菌が見られるという報告が A 群レンサ球菌以外の複数の菌について存在していたが、いずれの場合も LC3 のような特異的マーカーを使っておらずデータが曖昧で真偽ははっきりしなかった。また、それらの報告ではオートファゴソーム内で菌が生存しているとこれも確実な証拠無しに考えられていた。今回

我々が初めて、オートファジーによって細胞質に現れた菌が効率よく殺されることを明確に示した結果、細胞生物学と感染症・免疫学の両分野に新たな地平が開かれた。これまではエンドサイトーシス経路を突破した菌を殺すすべは無いと言われていたが、オートファジーが細胞質への菌の侵入を感知し捕食するという「細胞内免疫」のような役割を担っていることが判明した。オートファジーは本来、飢餓時に細胞が自己成分を分解して栄養源にする場合や、日常的な細胞成分の新陳代謝あるいは不要になったオルガネラの除去などに働く catabolic な細胞機能であるが、それを超えて、細胞外から侵入した病原細菌の排除という生体防御機能まで担っていたことは大きな驚きであった。我々の研究以降、様々な菌とオートファジーの関係が相次いで報告され、ひとつの分野が形成されつつあるといっても過言ではない。結核菌がオートファジーにより分解されるといっ

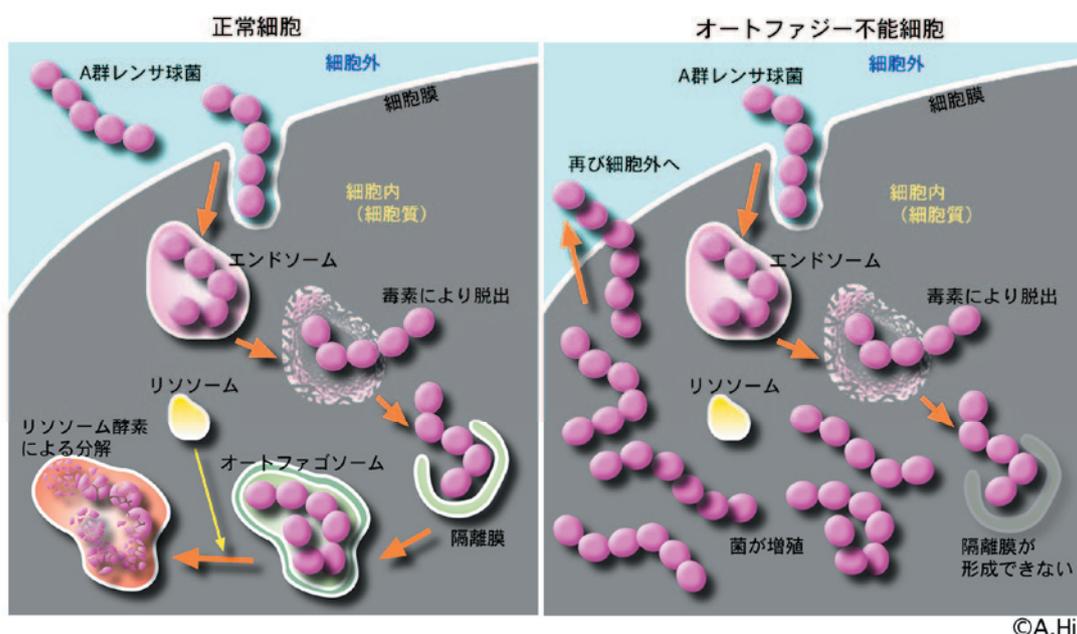


図 3 A 群レンサ球菌の細胞内侵入後の運命

た報告がなされる一方で、東大医科研の笹川千尋教授のグループは我々との共同研究により、赤痢菌がエンドソームを破って細胞質に現れるにもかかわらず、オートファジーの攻撃をも回避することを示した。赤痢菌は IcsB というたんぱく質を分泌しているが、それによって自己の菌体表層の VirG たんぱく質を覆い隠しオートファジーによる認識を防いでいた。IcsB を欠損する菌株はオートファジーによって殺された。オートファジー回避能力を持つため赤痢菌は、細胞内寄生性細菌として生きながらえることができる。さらには、ポリオウイルスなどがオートファゴソーム膜を使って自己の遺伝子を複製していることが報告され、宿主対病原微生物の果てしない進化上の攻防の様子が浮かび上がってきている。

(1)-1-2 A 群レンサ球菌を包み込む巨大オートファゴソームの形成機構

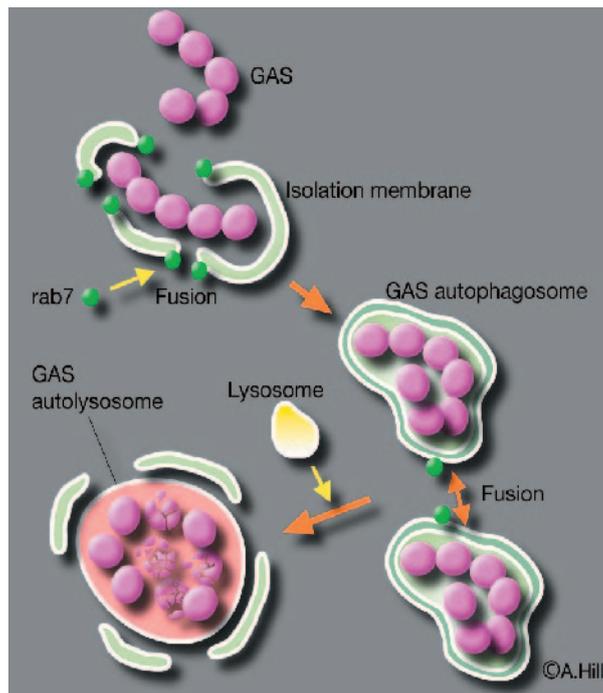


図 4 Rab7 を介した巨大オートファゴソーム形成

我々の解析は、A 群レンサ球菌に対するオートファジーが通常のオートファジーとは異なる面を持つことを示している。すなわち、菌の侵入に反応して誘導され菌を選択的に包み込んでおり、また通常サイズよりはるかに大きなオートファゴソームが形成される。このことは、細胞の代謝機能として酵母からヒトに至る全真核生物に普遍的に備えられたオートファジーに、進化の途上で生体防御のために特殊化したバージョンが現れたことを示唆する。それを分子レベルで明らかにするため、対病原体オートファジーの分子機構の解析を行っている。まず宿主細胞がどのようにして細胞質に現れた菌を認識するのか、宿主側と菌側の因子の同定を試み手がかりを得ている(天野グループの項参照)。また、A 群レンサ球菌を包み込むために巨大なオートファゴソームが形成される機序の解明も行った。蛍光顕微鏡-電子顕微鏡相関法を用いた詳細な解析により、連鎖している菌の周囲に複数の隔離膜(オートファゴソームの前駆体)が現れ、それらの隔離膜同士が融合して閉じた巨大オートファゴソームとなっている可能性が示唆された。次に、そのような融合を制御するたんぱく質として rab7 が働いていることを突き止めた。Rabファミリーは、メンブレントラフィックの制御たんぱく質群で60を超えるメンバーがそれぞれ別のステップで機能している。Rab7 は、エンドソームからリソソームへの輸送に関わる一方で、オートファゴソームとリソソームの融合にも必要である。しかし、オートファゴソームの形成自体には不必要なことが判明している。この rab7 の優性阻害変異体を細胞に発現し、内在性の rab7 の機能を阻害したところ、A 群レンサ球菌を感染させても隔離膜が時折見つかるのみで巨大オートファゴソームによる菌の包み込みが起こらなかった。また隔離膜にのみ結合する Atg5 に GFP を付け観察したところ、rab7 を阻害しても菌周囲にいつ

たんは隔離膜が形成されること、rab7 を阻害しない場合隔離膜に内在性 rab7 が結合していることから、rab7 が隔離膜同士の融合による巨大オートファゴソーム形成に関与していると結論した。Rab7 が通常のオートファゴソーム形成には必要ないことから、rab7 が付加的分子機構として援用され、生体防御に特化したオートファジーが現れたと推測している。なお、菌の包み込みが終了しても、オートファゴソーム同士の融合が盛んに起こりさらに巨大化していく様子をビデオ顕微鏡で捉えている。そのようなオートファゴソーム同士の融合の意味は不明である。菌が感染するまで存在しなかった巨大オートファゴソームが数時間の間に形成されるためには大量の膜供給が必要である。我々は、少なくともその供給源のひとつがゴルジ体であることを示唆する証拠を得ており、現在さらに解析中である。

(1)-2 オートファジーによる変性疾患原因たんぱく質の分解

$\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病などのいわゆるフォールディング病は、正常な立体構造が取れず細胞内に蓄積・凝集してしまうような異常たんぱく質により発症する。これまで、そのような易凝集性タンパク質の分解の研究は、ユビキチン・プロテアソーム系に主眼が置かれていた。同系と並ぶ主要な細胞内分解系であるオートファジーに関しては、疾患組織においてオートファゴソームの亢進、蓄積が見られるなどの報告はあったが、形態学的な研究にとどまっております詳細な解析は進んでいなかった。我々は、本研究において下記の2つの疾患についてオートファジーの関わりを明らかにすべくより直接的なアプローチを行った。

(1)-2-1 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症

$\alpha 1$ -アンチトリプシンは分子量 51K の糖タンパク質である。通常肝細胞で合成・分泌され血中で作用するタンパク質であるが、その遺伝子の Z 変異によって産物 (ATZ) の正常なフォールディングが阻害され凝集塊を形成する。その結果、分泌量が低下し欠損症を引き起こすとともに、小胞体への凝集塊の蓄積により肝障害の原因となる。これまでの研究によって、この遺伝子変異をもつ患者の肝障害の重症度には個人差が大きく、重症な患者の場合 ATZ の小胞体蓄積が軽症の患者に比べて多いことがわかっている。よって、ATZ の分解能力が症状の程度に関係していると考えられている。

ATZ の分解にはプロテアソームが関与していることが知られている。小胞体内で正常なフォールディングのできなくなった ATZ は、サイトゾルに逆行輸送され、ユビキチン・プロ

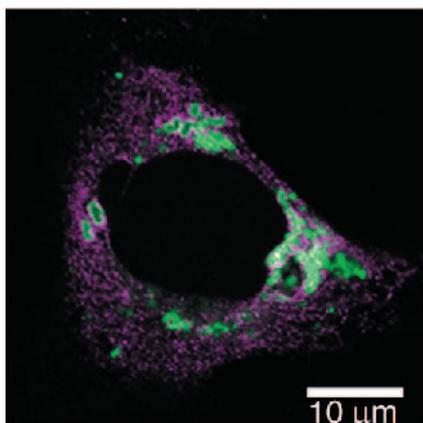


図 5 Atg5-KO 細胞では ATZ (緑) の凝集塊形成が促進される。赤紫は小胞体マーカー KDEL。

テアソーム系で分解される(ER-associated degradation : ERAD)。ERAD によって分解しきれない ATZ が凝集し細胞死を引き起こすと考えられてきた。一方通常飢餓などで誘導、亢進されるオートファジーが、ATZ を発現している細胞では常に亢進していることが知られていた。さらに、オートファジーの阻害剤である 3-メチルアデニンによって ATZ の分解が抑制されることが示されている。これらのことから、プロテアソームだけでなくオートファジーも ATZ の分解に関わっていると推定されていた。我々はピッツバーグ大学の Perlmutter 教授のグループの協力を得て、ATZ の分解とオートファジーの関係を明らかにするために更なる解析を進めた。3-メチルアデニンはオートファジーの阻害剤として古くから使われているが、その特異性は高くない。そこで、オートファジーが ATZ の分解に関わることをより直接的に証明するために、オートファジー不能である *Atg5^{-/-}* 細胞に

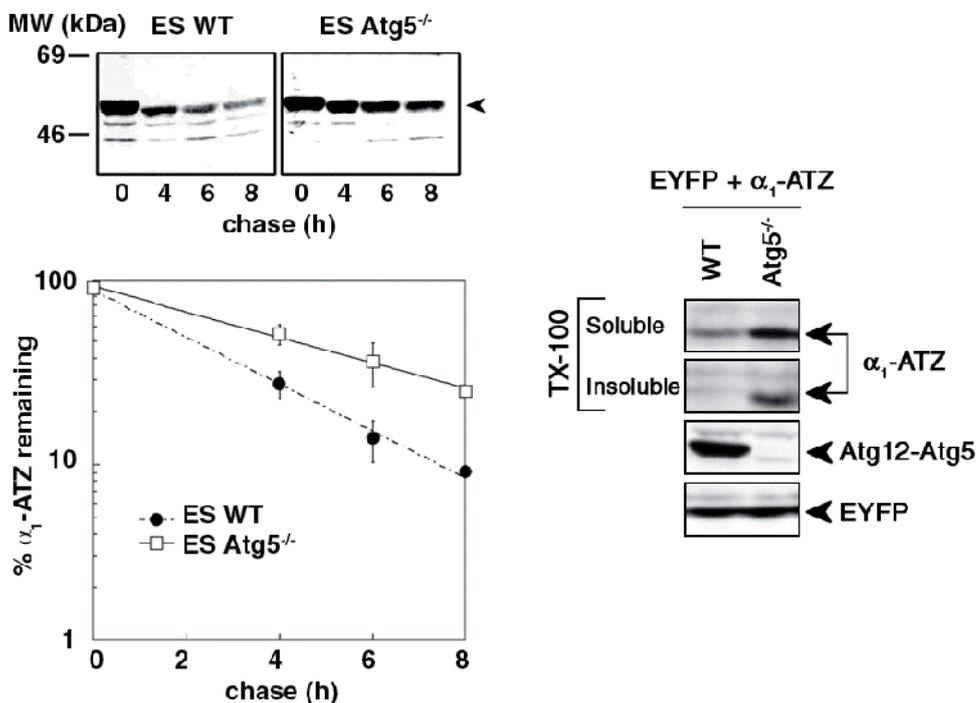


図6 オートファジーによる ATZ の分解
左：RI 標識によるパルスチェイス実験。右：ウェスタンブロット。

ATZ を強制発現させてその分解を調べた。すると、野生型の *Atg5^{+/+}* 細胞と比べて ATZ の分解速度が減少し、小胞体における凝集塊が増加していた。これによって初めて遺伝学的にオートファジーが ATZ の分解に関わっていることが証明された。コントロールとして YFP を発現させたときには ATZ と異なり *Atg5^{-/-}* 細胞においてもその分解に差はなかった。また、細胞内の ATZ の局在を調べてみると、オートファゴソームマーカーである GFP-LC3 と共局在していた。しかも、ATZ がオートファゴソーム内に濃縮されている像が観察された。これらのことは ATZ が選択的にオートファゴソームに包まれ分解されていることを示唆している。注目すべきことに、オートファゴソーム内には ATZ とともに KDEL 抗体で認識される可溶性の小胞体タンパク質が共局在していた。このような KDEL タンパク質は凝集塊を形成した ATZ とは共局在せず、凝集塊の所だけ抜けたように染色され

る。おそらくオートファゴソームによって囲まれているのは凝集塊ではなく、凝集塊を形成する前の可溶性の ATZ、もしくは小さな凝集塊を囲んでいるのではないかと我々は考えている。また、マウスの肝細胞では、ATZ の発現を誘導するとオートファジーが亢進することを GFP-LC3 の輝点の増加で確認している。このとき、凝集塊を持つ細胞だけではなく、凝集塊を持たない細胞でも、オートファジーが亢進していることがわかった。ATZ によるオートファジーの誘導は凝集塊を形成する以前に起きている可能性がある。

小胞体内の異常たんぱく質を、ERAD だけではなくオートファジーが分解していることを明確に示した報告はこれが初となる。小胞体内にある ATZ を細胞がどのように認識し、

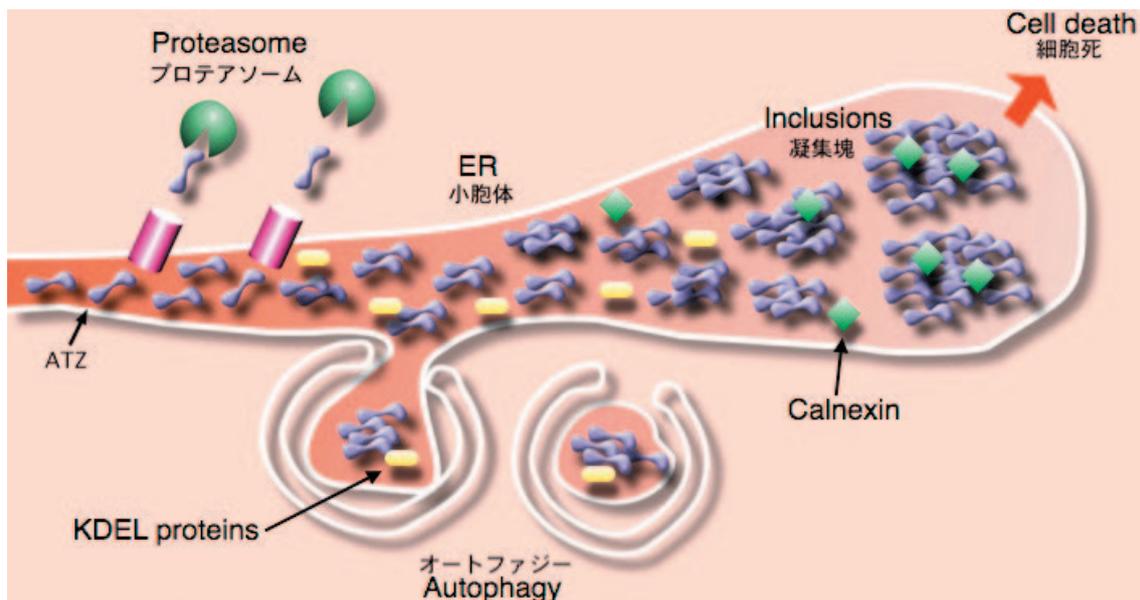


図 7 ATZ 分解の模式図

オートファゴソームで囲い込んでいるのか興味深い。小胞体は細胞内カルシウム濃度の変化などによって断片化を起こすことが知られており、一つの可能性として、この断片化した小胞体ごと ATZ をオートファゴソームが囲い込んでいることも考えられる。

(1)-2-2 ポリグルタミン病

ハンチントン舞踏病をはじめとしたポリグルタミン病と呼ばれる神経変性疾患では、原因タンパク質に含まれる連続したグルタミンの配列が、遺伝的原因によって異常に長くなるのが病因となり、神経変性や行動異常を引き起こす。伸長したポリグルタミン鎖を含むたんぱく質(長鎖 polyQ)は細胞質内に蓄積し、界面活性剤不溶性の凝集塊をつくる。ハンチントン舞踏病のモデルマウス、患者組織においてオートファジーが亢進しているとの報告があったので、本研究で詳細な検討を加えた。まず、Atg5^{-/-}細胞に長鎖 polyQ (62 ないし 81 個のグルタミン)を発現させると野生型の Atg5^{+/+}細胞と比べて凝集塊の数が著しく増加し、さらに細胞の生存率が低下する。また、長鎖 polyQ を細胞内に発現させ電子顕微鏡で観察したところ、凝集塊の有無に関わらずオートファゴソームの増加が見られる。ただし、凝集塊を包み込むような大きなオートファゴソームは観察され

ず、通常サイズのものが凝集塊とは無関係に細胞質にランダムに形成されていた。凝集塊を形成せず病気も起こさない短鎖 polyQ (19 個のグルタミン) の場合ではこのような増加は見られない。さらに大腸菌で発現精製した polyQ たんぱく質を顕微注入により細胞内に導入したところ、注入後数分以内にオートファゴソーム形成が誘導された。これは凝集塊を形成する長鎖 polyQ でのみ観察され、凝集塊を形成しない短鎖 polyQ では誘導は見られなかった。この実験に用いた長鎖 polyQ はまだ凝集していない可溶性のもので、念のため遠心処理で凝集塊を除く操作をしている。細胞に注入された長鎖 polyQ が凝集塊を形成するのは 10 数時間経ってからであった。これらのことから、オートファジーを誘導しているのは大きな凝集塊ではなく、凝集塊を形成する前のオリゴマーか微小凝集塊の長鎖 polyQ ではないかと我々は考えている。細胞がどうやって、短鎖と長鎖の違いを識別するのか興味深い。現在長鎖 polyQ を特異的に認識しオートファジーを誘導する因子の同定を試みている。

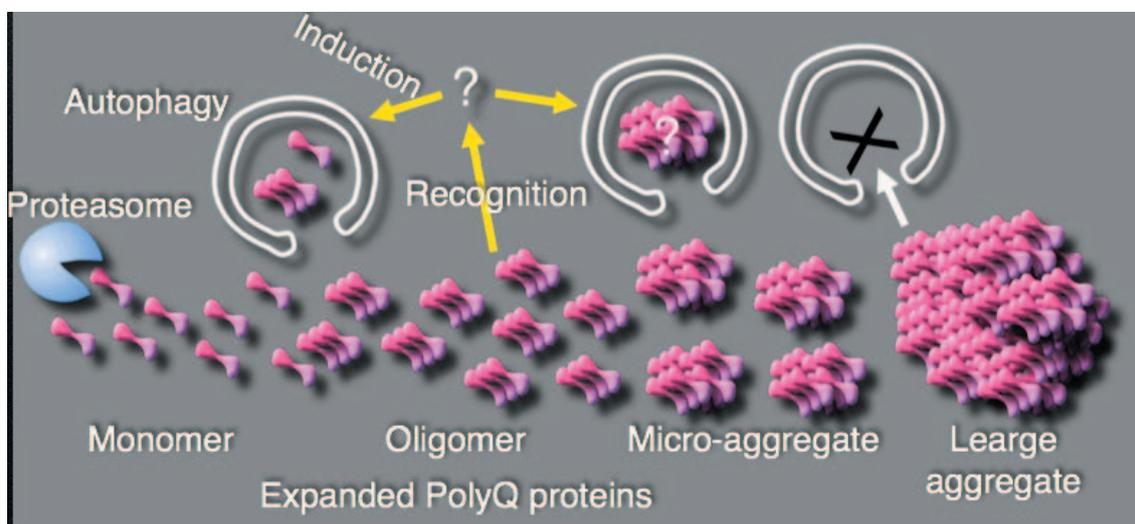


図 8 PolyQ 分解の模式図

我々が研究を開始した後、polyQ とオートファジーの関係を探る試みが世界中で活発化し、残念ながら論文発表で先行された。Rubinsztein のグループはラパマイシンという薬剤を用いてオートファジーを亢進させると、長鎖 polyQ の分解が促進されるが、短鎖 polyQ では分解の促進は顕著には見られないことを示した。彼らの結果も我々と同様に、長鎖 polyQ をオートファジーが選択的に分解している可能性を示唆している。彼らはハンチントン舞踏病のモデルマウスにおいても、ラパマイシン投与によって神経変性や行動異常が改善されるとしている。Kopito のグループは polyQ が形成する凝集塊がオートファゴソームマーカーである LC3/Atg8 に囲まれていることを抗 LC3 抗体を用いた免疫細胞染色によって示した。また、siRNA によりオートファジーに必須な遺伝子である Atg5、LC3 をノックダウンした場合、polyQ 凝集塊を含む細胞が増加することを示した。これらの結果から、彼らはオートファジーによって凝集塊そのものが分解されることを主張している。先行はされたものの我々の研究は、これらと比べノックアウト細胞を用いたより強固

な証拠であることや、凝集塊形成に至っていない長鎖 polyQ がオートファジーを強く誘導するという新しい知見を含む点が異なる。また Kopito らの巨大オートファゴソームが凝集塊を包むという主張は誤りだと思われる。Mizushima らが、LC3 が凝集塊に巻き込まれやすい性質を持っており、Atg5^{-/-}細胞でも LC3 と polyQ 凝集塊の共局在が観察されることを報告しており、我々はそのような像が得られた部位を電子顕微鏡で観察しても膜構造が見あたらないことを確認している。

最近、長鎖 polyQ の細胞毒性は可溶性の方が強く、凝集塊は可溶性 polyQ を無毒化し細胞を保護するために形成されているという説が有力となってきた。オートファジーが細胞を保護するために働くとする、凝集塊ができる前の可溶性の長鎖 polyQ を認識して分解するという考え方は理にかなっているように思われる。この仮説の立証を現在鋭意進めている。

(1)-3 オートファジーの分子機構

ここ数年、世界におけるオートファジー研究は爆発的な進展を見せており、論文数も鰻上りの状況にある。しかしながら、その多くはオートファジーが特定の疾患や生理機能と関連がありそうだという現象の記述であり、メカニズムに正面から取り組んだ報告はまだ少ない。分子基盤が不明のままでは、生体における役割の解明も早晚壁に突き当たることは火を見るより明らかである。本研究では、オートファジーの分子機構の解明を機能の究明と並ぶ大目標に設定し力を注いだ。その結果、以下にあげる複数の重要な成果を得た。

(1)-3-1 オートファゴソームの移動の分子機構と意義

我々は、GFP-LC3 を用いたオートファゴソームのビデオ顕微鏡観察から、オートファゴソームは完成後に直線的に細胞質中を移動することに気付いた。オートファゴソームは細胞内を数マイクロメートル/秒の速度で移動しており、細胞を微小管重合阻害剤で処理すると停止した。オートファゴソームと微小管の共局在も多数観察された。オルガネラが微小管に沿って移動することはよく知られている。移動にはダイニンやキネシンなどのモーターたんぱく質が必要である。我々は、ダイニンの機能を阻害するダイニン複合体成分のダイナミチンの過剰発現やダイニン抗体の顕微注入によってオートファゴソーム移動が阻害されることを示した。よって、ダイニンがオートファゴソーム移動の主モーターであると結論した。さらに LC3 抗体の顕微注入によりオートファゴソームの移動が止まることも明らかになった。LC3 には微小管結合領域があり、その領域の合成ペプチドに対する抗体でも移動を阻止できることから、LC3 がオートファゴソームを微小管にリクルートしているのかもしれない。

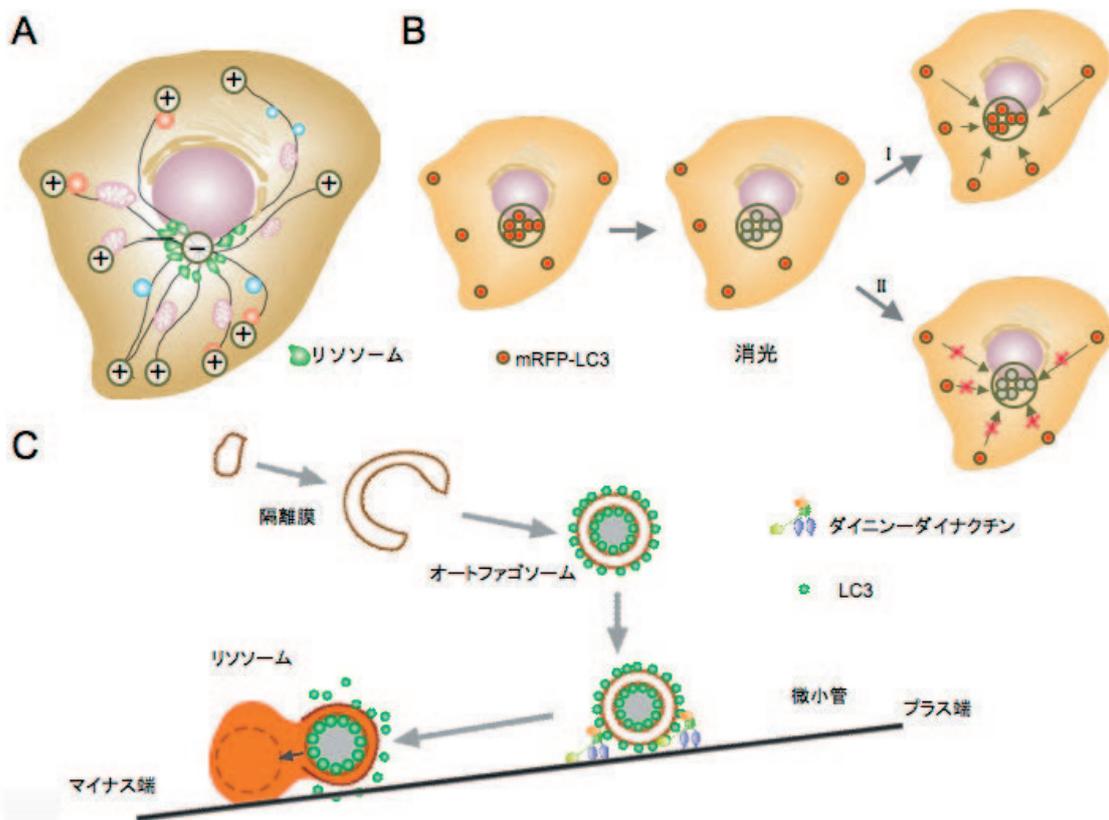


図9 オートファゴソームの細胞内移動

A: 動物細胞では微小管が発達しており、オルガネラの配置、移動に関わる。リソソームは、微小管のマイナス端である中心体付近に集まる。B: オートファゴソーム移動のFRAP解析。C: オートファゴソーム移動のモデル。

我々は次に、オートファゴソームが何故微小管上を移動するのかという疑問に答えるため解析を進めた。動物細胞では、リソソームは核近傍の中心体付近に集積している場合が多い。一方、オートファゴソームはいたる所で形成されるので、細胞辺縁部で形成されたオートファゴソームがリソソームと出会い融合するためには、核近傍に移動する必要がある。微小管は中心体から放射状に伸びており、ダイニンモーターはオルガネラを中心体方向に移動させることが知られている。そこで、オートファゴソームの微小管とダイニンによる移動がどれほどオートファジーに貢献しているかを調べるために、次の様な実験を行った。リソソームマーカーである GFP-lamp1 と mRFP-LC3 の一部は共局在する。これはオートファゴソームとリソソームの融合の結果と考えられる。核近傍のリソソームと共局在している mRFP-LC3 の蛍光を一度レーザーで消光させ、その回復を観察するFRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)を行うことでオートファゴソームのリソソームへの融合を測定することに成功した。すなわち、消光後時間に依存して mRFP-LC3 の共局在が回復した。辺縁で形成されたオートファゴソームの移動が回復に寄与しているかどうかを調べるため、LC3 抗体の顕微注入を行った。蛍光の回復は、抗体によるオートファゴソームの移動阻害により著しく遅れた。従って、オートファゴソームがリソソームと効率よく出会い融合するために、微小管とダイニンによる移動が重要であると結論した。なお出芽酵母では微小管はオートファジーに必須ではない。酵母では細

胞の大部分をリソソームに相当する液胞が占めるため、オートファゴソームの能動的な移動は必要ないのであろう。

我々が研究を進めている途上で、オートファゴソームの微小管に沿った移動が2つのグループから報告された。従ってその点に関する新規性は無くなったが、我々の結果はそれらの報告には無いダイニンモーターや LC3 の関与を含み、さらに移動の意義という重要な知見を得た点で貢献度が大きいと自負している。それらの報告のひとつは、微小管重合阻害剤処理でオートファゴソームとリソソームの融合効率が低下しなかったため、微小管に沿ったオートファゴソームの移動は、リソソームとの融合に寄与しないと結論している。しかし、リソソームの核近傍への集積も微小管依存的なので、阻害剤によって人為的にそれが乱されると辺縁部に散ったリソソームとオートファゴソームが会ってしまい、そのためオートファジーの効率はさほど変わらない。我々が用いた抗 LC3 抗体注入は微小管の重合状態には影響しないことを確認しており、オートファゴソームの移動のみを阻止できるので移動の重要性を示すことができた。

(1)-3-2 ベクリン結合たんぱく質の同定

ベクリンは酵母 Atg6 のホモログで、III 型 PI3 キナーゼと複合体を作りオートファゴソーム形成に必要な脂質 PI3P の産生を制御している。我々は、2重タグ (MEF tag) 法を用いた結合たんぱく質の探索及び質量分析から、III 型 PI3 キナーゼ以外のベクリン結合たんぱく質として、既に報告のある UVRAG と2つの新規たんぱく質 p70 と p130 を同定した。これらのたんぱく質に対する抗体を作成し、細胞の内在性たんぱく質について共免疫沈降実験を行ったところ、ベクリン-PI3 キナーゼ複合体にはサブユニットとして、p70 を持つもの (複合体 I) と p130 及び UVRAG を持つもの (複合体 II) の2種類が存在することが判った。蛍光顕微鏡による局在観察では、p70 はオートファゴソームに、UVRAG と p130 はエンドソームに分布していた。さらに、RNA 干渉法による発現抑制実験で、複合体 I はオートファジー、複合体 II はエンドサイトーシス経路で働くことが明らかになった。p130 の過剰発現により、エンドソームの肥大化とエンドサイトーシス経路の輸送阻害が



図 10 2つのベクリン複合体
文中の p70 は Atg14 homologue, UVRAG は Vps38 homologue,
p130 は ProteinX と表記している。

生じた。酵母 Atg6 も機能の異なる2種類の複合体を作ることが知られているが、オートファジーに働く複合体のサブユニットの Atg14 が p70 と、ゴルジ体ー液胞経路に働く複合体のサブユニット Vps38 が UVRAG と、それぞれ弱い相同性を持つことも判明した。p130 に相当するものは酵母には無く、線虫以降の生物種から現れる。p130 を介したオートファジーとエンドサイトーシス経路の間のクロストークを示唆する結果も得られており、注目される。

ベクリンは幾つかの報告から、オートファジーにのみ働くとしてきた。我々の発見はそれを覆すものである。Atg5 や Atg7 のノックアウトマウスが生後まもなく死ぬのに対しベクリンノックアウトマウスは胎生致死である。これはベクリンがオートファジーに加えエンドサイトーシス経路でも働いていることと合致する。これまでにベクリンのノックアウトやノックダウンから、オートファジーの関与を吟味する論文がいくつも出ており、それらの再検討も今後必要であろう。

(1)-3-3 Atg5-Atg12-Atg16L 複合体の機能

オートファゴソームの形成には Atg12 結合系、LC3 結合系の2つのユビキチン様反応系が必須である。前者は、Atg12-Atg5 共有結合体を、後者は LC3 に脂質であるフォスファチジルエタノールアミン[PE]が共有結合した LC3-II を最終産物として産生する。Atg12-Atg5 はさらに Atg16L と複合体を作る。LC3-II や Atg12-Atg5-Atg16L がオートファゴソーム形成においてどのような役割を持つのかは明らかになっていない。また Atg12-Atg5-Atg16L に不全があると LC3-II の形成が著しく低下するので、これら2つの結合系には機能的連関があると考えられるがその詳細は不明であった。我々は、Atg12 と Atg16L の過剰発現に LC3-II 形成に対する優勢阻害効果があることを見いだしたので、それを詳しく解析することで Atg12-Atg5-Atg16L の機能を知ることができるのではないかと考えた。解析の結果、Atg16L が未知の因子 X を介して特定の膜と結合し、一方 Atg12 が LC3-II 形成の E2 酵素にあたる Atg3 に結合することで、その膜で LC3 に PE が共有結合し II 型が生じることが判った。すなわち、Atg12-Atg5-Atg16L 複合体はユビキチン化反応で言うところの E3 酵素として機能していると言える。ただ、普通 E3 はユビキチン化の基質となるたんぱく質を認識するが、この複合体の場合それが膜であるという点が非常にユニークである。複合体に細胞膜局在化シグナルを移植し強制的に細胞膜に分布させると、LC3-II が細胞膜で形成された。従って LC3 自身には局在化シグナルは無く、Atg12-Atg5-Atg16L がどの膜で LC3-II を作るかを決定していると結論した。実際には LC3-II は、オートファゴソーム膜の元となる小胞に局在化しそれがオートファゴソームに成長するのを促すと考えられる。その元となる膜の由来について、永らく論争が続いているか未だ不明のままである。LC3-II をそこにリクルートする Atg16L の膜局在化機序の解析から、オートファゴソーム膜の起源を知ることができるのではないかと考えている。

(1)-3-4 新規オートファジープローブの開発

オートファゴソームは最終的にリソソームと融合するので、LC3 の少なくとも一部とリソソームマーカーは共局在するはずである。ところが、我々は mRFP-LC3 ではそれが観察されるのに、GFP-LC3 はほとんどリソソームマーカーと共局在しないことに気付いた。この違いが、2つの蛍光たんぱく質のリソソーム環境に対する抵抗性の差によるのではないかと考え解析を行ったところ、リソソーム内部をイオノフォアで中性化し、消化酵素阻害剤でたんぱく質分解を抑制すると、GFP-LC3 とリソソームの共局在が見えるようになった。これは、GFP の蛍光がリソソームの酸性環境で減弱し、かつたんぱく質自身が酵素による分解を受けやすいためと考えられる。この性質を利用して、新規のモニターたんぱく質を開発した。GFPとmRFPをタンデムにLC3につないだもの(tfLC3)で、緑と赤の両方の蛍光を発する輝点はリソソームと融合していないオートファゴソームを、赤だけの輝点は融合後のオートリソソームを示すことになる。オートファゴソームが多数観察された場合に、それがオートファジーの亢進の結果なのか、リソソームとの融合が阻害された結果なのかこれまでは判別が困難であったが、このプローブを用いれば一目瞭然である。オートファジーの過程を空間的かつ段階的に追える有用なプローブとして、論文発表後多数のリクエストが届いている。

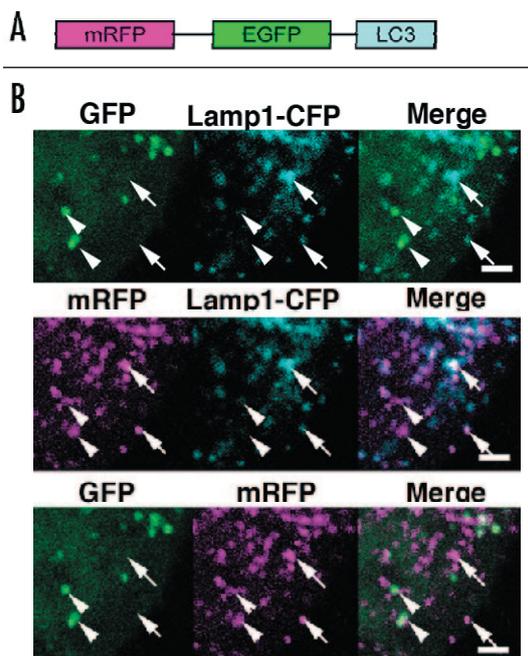


図 11 tfLC3 とリソソームマーカーLamp1の共局在
GFP の蛍光は mRFP の蛍光と完全に一致するが Lamp1 とは共局在しない (矢頭)。GFP と一致しない mRFP は Lamp1 と共局在する (矢印)。前者はオートファゴソーム、後者はオートリソソームを示している。

(1)-4 エンドサイトーシス経路

エンドサイトーシス経路では、細胞外や細胞膜から取り込まれた物質がエンドソームを経由してリソソームに運ばれる。エンドソームから細胞膜に戻される場合もあり、エンドソームは被輸送分子の選別の場となっている。この選別は細胞の生存や機能に重要で、例えば成長因子受容体の細胞膜へのリサイクルが過剰になると増殖刺激を受けすぎ細胞は癌化する。一方、種々の病原微生物がエンドサイトーシス経路を介して細胞内に

侵入するため、本経路は病理学的にも重要性が高い。本研究では、エンドソームにおける選別と、エンドサイトーシス経路を介した病原細菌の細胞内侵入に焦点を絞り研究を展開した。

(1)-4-1 エンドサイトーシス経路を介した菌周病菌の細胞内侵入機構

吉森グループの津田が、天野グループに出向き解析を行ったので天野グループの項に記載する。

(1)-4-2 エンドソームにおける上皮成長因子受容体のユビキチン化

エンドソームにおける選別の信号はユビキチン化である。ユビキチン化された被輸送分子は、エンドソームの内腔小胞に移行しそれごとリソソームに運ばれ分解される。我々は、この選別の分子機構の理解を進めるために、上皮成長因子受容体(EGFR)のユビキチン化について詳細な解析をおこなった。まず、EGFRのE2酵素が従来言われていたUbcH7ではなくUbc4/5であることを示した。次に、E3酵素であるc-CblとUbc4/5がEGFRと共に細胞膜からエンドソームに移動することを見いだした。EGFRのユビキチン化は細胞膜で起こるが、エンドソームに至る途中でも起こっている可能性が出てきたので、細胞膜でユビキチン化された後にc-Cblの活性を阻害する操作を行ってみた。すると、驚いたことにその後のユビキチン化が起こらないだけでなく既にEGFRに結合していたユビキチンまではずれてしまった。その結果リソソームに運ばれなくなった。従って、細胞質の脱ユビキチン化酵素に拮抗して、エンドソームへの輸送過程でもEGFRをユビキチン化し続ける必要があるものと思われる。実際タイムコース実験で、EGFRが最初は複数箇所でモノユビキチン化され輸送中にそれがポリユビキチンに変更されることが示された。エンドソームにおける選別のためのユビキチン化について、新たなモデルが提示された。

(2)研究成果の今後期待される効果

メンブレントラフィック研究の始まりは、1960年代のG. Paladeによる分泌経路の発見(Paladeはその功によりノーベル賞を受賞)に遡る。本研究のメインテーマであるオートファジー経路は分泌経路とほぼ同時期に発見されていたものの、永らく解析が進まずメンブレントラフィック領域において最後まで残された「秘境」であった。だが約10年前の大隅良典教授(現基礎生物学研究所)らによる酵母ATG遺伝子群の同定を契機に状況は一変する。分子メカニズムが急速に明らかになると同時に、その予想外の役割が次々と見付き極めて重要な生理機能であることがわかってきた。ここ数年論文数も激増し、オートファジーは生命科学における最もホットな分野のひとつとなりつつある。そのなかで研究代表者は哺乳類オートファジーの膜ダイナミクスと分子機構の解析を行ってきた。本研究の開始に伴いそれをさらに推進すると同時にオートファジーの新たな役割の探求にも着手し、オートファジーによる細胞内侵入病原細菌の排除の発見という予期せぬ

成果を得ることができた。この発見は、オートファジーの分野に新たな1ページを開いただけでなく、感染症学、免疫学における大きなトピックとなった。エンドサイトーシス経路を突破し細胞質に入り込んだ病原微生物を排除するすべはないというそれまでの認識は崩れ、細胞内にも一種の「免疫系」があるという全く新しいコンセプトが生まれた。我々の報告以降、様々な病原微生物についてオートファジーとの関係が調べられるようになり、新規の分野が成立しつつあると言っても過言ではない。オートファジーを介した宿主対病原体の多彩な攻防の様子が垣間見え始めており、細胞生物学的にも、感染症の予防治療の観点からも今後のこの分野の進展が注目される。

我々はさらに、オートファジーによる易凝集性たんぱく質の選択的分解を示す知見を得た。すなわちオートファジーは、病原細菌や疾患原因たんぱく質などの細胞にとっての「招かれざる客」を隔離・分解するという広範な生体防御機能を持つことが、本研究により明白となった。感染症も神経変性疾患に代表されるフォールディング病も社会的に大きな問題となっている疾患である。本研究は、それらの克服を目指す臨床医学に資する知的資産を創出したと考えている。今後オートファジーの特異的促進薬の開発などの動きが加速されるであろう。

オートファジーによる細菌排除の発見は、当時は本研究チームのメンバーではなかった天野グループとの共同研究の結果である。この共同研究を通して、細胞生物学と細菌学が緊密に連携すれば、宿主細胞と病原細菌の複雑な相互作用としての感染現象に新たな切り口から迫ることができるという教訓を得て、本研究のなかばから天野グループの参加を仰いだ。そしてオートファジー研究に加えて、人類史上最大規模の慢性疾患で長寿社会における quality of life を脅かす歯周病の原因菌の細胞内侵入機構解明のプロジェクトに取り組んだ。本菌は、臨床的な重要性にもかかわらず侵入メカニズムなどの基礎的知見に乏しい。本研究においてブレイクスルーとなる成果を得ることができ両分野融合のモデルケースとなったと考えている。

生命機能の包括的理解には、その分子基盤の解明が必須である。オートファジーの多彩な役割が明らかになってきた背景に、Atgたんぱく質の同定に始まる分子機構の解析進展があったことは論を俟たない。本研究では、機能的解析の一方でメンブレントラフィックの分子機構の解明を着実に進め、幾つかの重要な知見を得た。今後の分野の発展の礎を築くことができたと考えている。

3.2 病原性細菌の解析

(大阪大学 天野グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

天野グループは、吉森グループの重点研究目標である「メンブレントラフィックと疾患の関係解明」に参画し、吉森グループとの相補的研究活動を推進することを目的とした研究活動を展開した。すなわち、宿主細胞のメンブレントラフィック機構が細胞内侵入性病原細菌に対して果たす排除機能を明らかにすることを目標とし、特に細菌側の責任分子の同定を目指した。対象とした細胞内侵入性病原細菌は「咽頭炎の原因菌・A 群レンサ球菌」ならびに「歯周病菌・*Porphyromonas gingivalis*」である。

A 群レンサ球菌に関する研究成果

細胞外から物質を取り込み運ぶエンドサイトーシス経路は、病原微生物の侵入経路でもある。咽頭炎の原因菌であり、時に劇症型感染症を惹起するA群レンサ球菌は、一度はエンドゾームに取り込まれるものの、やがて細胞質に脱出する。しかし、菌の細胞質への脱出に伴いオートファジーが誘導され、菌は巨大なオートファゴソームに効率よく包み込まれ分解される。オートファゴソーム形成不全細胞では、A 群レンサ球菌は細胞質で増殖し、再び細胞外に出ていく。本来オートファジーは他のオルガネラや細胞質の一部を囲い込み、それらをリソソームに運び込んで分解・消化するシステムであるとされてきた。この知見はこれまで知られていなかったオートファジー機能であり、このことはオートファジーが自然免疫機構の一端を担っていることを強く示唆するものであった。これら吉森グループとの共同研究による成果(2004年末にScienceに掲載)を受け、我々のグループでは、オートファジーの細菌排除機構が他の細菌種に対しても普遍的に機能するものであることを明らかとするため、A 群以外のレンサ球菌およびドウ球菌属に対してもオートファジーによる細胞内細菌排除が機能することを確認した(投稿準備中)。さらに、広範な院内感染を惹起する抗生物質耐性菌 MRSA がオートファジーによる細菌排除機能に対して抵抗性を有することも見いだした(投稿準備中)。さらに「オートファゴソーム形成を誘導する A 群レンサ球菌の菌体成分」の同定もほぼ完了している。

P. gingivalis に関する研究成果

P. gingivalis は人類史上最も患者数が多い感染症である歯周病の原因菌である。近年、歯周組織を構成する細胞内に侵入することにより、*P. gingivalis* は宿主免疫からの攻撃を回避し細胞内増殖を果たしている可能性が示された。しかし、*P. gingivalis* の細胞侵入機構、利用する細胞オルガネラ、細菌侵入に対する細胞応答、そしてその後の *P. gingivalis* と細胞の運命に関する明確な知見はほとんど得られていなかった。このような背景において、我々は次のような研究成果を上げた。

(1) *P. gingivalis* の細胞侵入とエンドサイトーシス

P. gingivalis の細胞内侵入メカニズムに詳細な検討を加えた。その結果、*P. gingivalis* は菌体表層の線毛を宿主細胞表層の $\alpha 5 \beta 1$ -integrin と結合し細胞侵入を開始すること、その後、リポッドラフトをプラットフォームとして、PI3kinase、Racを介して宿主細胞のエンドサイトーシス経路を活性化し、細胞による取り込みを誘導し、細胞内への侵入を果たすことが示された(図1。Tsuda et al., Cell Struct Funct, 2004, Infect Immun、投稿中)。*P. gingivalis* の細胞内挙動においては、A群レンサ球菌に見られたようなエンドゾームからの細胞質への脱出や、オートファゴソームによる取り込みは非常に頻度が低い現象であることも併せて明らかとなったが、この結果は予想外の知見であった。

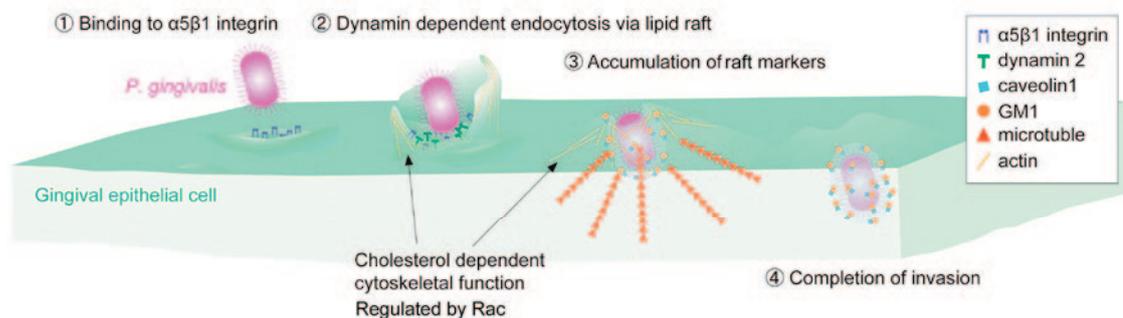


図1 *P. gingivalis* の細胞侵入機構

P. gingivalis は $\alpha 5 \beta 1$ -integrin との結合により細胞侵入を開始し、細胞骨格繊維の重合再編成を利用し、リポッドラフトおよび dynamin 2 依存性クラスリン非依存エンドサイトーシスを介して細胞内侵入を果たしている。

(2) *P. gingivalis* の細胞内移動と細胞骨格繊維

細胞内 *P. gingivalis* の周囲にアクチンおよび微小管 (tubulin) の集束が確認され、*P. gingivalis* の細胞侵入および細胞内移動にはアクチン、微小管の重合あるいは脱離が必須であると考えられた。*P. gingivalis* は細胞骨格繊維の重合再編成を利用し、リポッドラフトおよび dynamin 2 依存性クラスリン非依存エンドサイトーシスを介して細胞内侵入を果たし、さらに細胞骨格繊維を利用して細胞内移動を果たしている可能性が示され、歯周病の発症・進行に関わる感染経路において、重要なステップである *P. gingivalis* の細胞内感染機序の一端が明らかとなった。

(3) *P. gingivalis* の細胞侵入効率を決定づける線毛遺伝子多型

P. gingivalis 線毛のサブユニットタンパク質 fimbriin をコードする *fimA* 遺伝子を欠失させたミュータントは宿主細胞への付着・侵入ができなくなる。この線毛遺伝子には

核酸配列構造の違いにより6つの遺伝子型（I～VおよびIb型）が存在し、遺伝子型により線毛形態は異なり、線毛タンパク質の抗原性も異なる。抗原性が異なれば、線毛が発揮する病原性も遺伝子型により異なる可能性が高い。我々が行った疫学的調査では、歯周病患者からはII型線毛遺伝子を有する *P. gingivalis* が高頻度で検出され、非歯周病成人からはI型線毛クローンが高頻度で検出された。6つの線毛遺伝子型の代表菌株を用いた実験では、II型線毛遺伝子をもつ *P. gingivalis* 株は他の

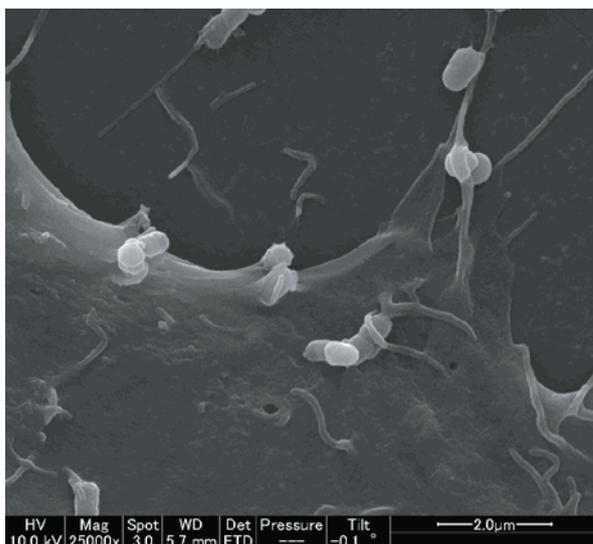


図2. II型線毛株をもつ *P. gingivalis* 変異株の細胞侵入動態細胞侵入機構
II型線毛遺伝子に置換された株は顕著な上皮細胞への侵入能を発揮した。

線毛型株に比べ、遙かに効率よく細胞内に侵入し、細胞の migration や proliferation を制御する細胞内シグナル分子 paxillin と focal adhesion kinase (FAK) を選択的に分解した (Nakagawa et al., Infect Immun, 2006)。また、細胞内 *P. gingivalis* は細胞のアポトーシスを抑制し自分の寄生場所を長もちさせようとする傾向があるが、II型 *P. gingivalis* はむしろ細胞のアポトーシスを誘導する傾向を示した (Inaba et al., Infect Immun, 2006)。これらの結果はII型線毛クローンの強力な細胞傷害性を示している。しかし、この実験で用いた菌株間には線毛以外にも異なる因子が多数存在し、線毛遺伝子多型だけが細胞傷害性の多寡の原因とは

断言できなかった。そこで I型およびII型線毛株の線毛遺伝子を相互に置換した変異株を作製し、細胞傷害性の変化を観察した。その結果、II型線毛遺伝子に置換された株は顕著な細胞侵入能を示すとともに、paxillin と FAK を直ちに分解し、細胞増殖、細胞遊走能などに顕著な阻害活性を示し、II型線毛と細胞傷害性との強い関連が示された (Kato et al., Cell Microbiol. 2007)。この知見は歯周病菌の遺伝子型により病原性の多寡を判定しうる可能性を強く示唆しており、今後の臨床応用に繋がるものである。

(2)研究成果の今後期待される効果

我々が臨床で向かい合っている中高年患者層は、感染症に対する抵抗性が高い世代かもしれない。緑色の鼻汁を垂らしていた子供を多く見かけた世代であり、様々な小

さな細菌感染に洗われ、正常な免疫力を獲得して成長してきた世代である。歯周病や A 群レンサ球菌感染症は宿主免疫の低下を原因とする日和見感染の色彩が強い疾患である。生活環境の変化や抗生物質の乱用などによって免疫バランスを崩し、またアトピーや花粉症などのアレルギー発症者が多い現代の若年世代が中高年世代となる時、これら病原菌による感染症はますます蔓延しているのではないだろうか。感染症から彼等を守るため、特に歯を失う悲しみから彼等を守るために、研究の歩みを速めなければならない。今回の CREST 研究により、細胞内侵入性細菌に対する宿主細胞の反応動態が分子レベルで明かとなった。特に、今まで研究の光が当てられていなかった、歯周病菌の細胞内侵入のメカニズム解析は、慢性感染症である歯周病の病態の理解に大きく貢献した。これまでの我々の研究成果に加え、さらに歯周病感染とメンブレントラフィックの関係を明らかにすることが、歯周病治療・予防のブレイクスルーとなるのではないかと考えている。

4. 研究参加者

① 吉森グループ(たんぱく質と膜が造る細胞内物流システムの解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
吉森 保	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	教授	全計画の指 揮と総括	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
野田 健司	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	准教授	遺伝学、細 胞生物学 的解析	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
梅林 恭平	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	助教	遺伝学、細 胞生物学 的解析	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
奈良 篤樹	国立遺伝学研究所	ポストク クレスト 研究員	エンドソーム 系の解析、 たんぱく質 精製	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
星野 光伸	国立遺伝学研究所	ポストク クレスト 研究員	オートファジ ーの解析	平成 16 年 10 月～ 平成 18 年 3 月
山上 恵	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	ポストク クレスト 研究員	エンドソーム 系の解析	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 9 月
神本 高宏	国立遺伝学研究所	ポストク	オートファジ ーの解析	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
庄司志咲子	国立遺伝学研究所	大学院生	異常たんぱ く質蓄積症 の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 15 年 9 月
津田香代子	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	ポストク	細菌の細胞 内侵入の解 析	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
木村 俊介	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	ポストク	オートファジ ーの解析	平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月

山口 ひとみ	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーとエンドソーム系の解析	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
松永 耕一	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーの解析	平成 16 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
藤田 尚信	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーの解析	平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
田口奈緒子	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーとエンドソーム系の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
田端 桂介	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーとエンドソーム系の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
林 拓哉	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーとエンドソーム系の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
大森 弘子	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	クレスト 技術員	電子顕微鏡による解析	平成 16 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
畠中 靖恵	国立遺伝学研究所	クレスト 技術員	実験補助	平成 15 年 5 月～ 平成 16 年 4 月
境 雅子	国立遺伝学研究所	技術員	遺伝学、細胞生物学的解析	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 3 月
佐藤 文	国立遺伝学研究所	専門学校生	実験補助	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 1 月
蔭山 俊	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーとエンドソーム系の解析	平成 19 年 4 月～ 平成 20 年 3 月

池上憲太郎	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーとエンドソーム系の解析	平成19年4月～ 平成20年3月
中山博登	大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野	大学院生	オートファジーとエンドソーム系の解析	平成19年4月～ 平成19年9月
福川美津子	国立遺伝学研究所	クレスト 事務員	研究チームの事務	平成14年11月～ 平成18年3月
仁木 宏典	国立遺伝学研究所	教授	細菌側因子の解析	平成18年4月～ 平成20年3月

②天野グループ(病原性細菌の細胞内侵入機構の解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
天野 敦雄	大阪大学歯学研究 科口腔分子免疫制 御学講座	教授	細菌の細胞 内侵入機構 の解析	平成16年4月～ 平成20年3月
河合 伸治	大阪大学歯学研究 科口腔分子免疫制 御学講座	助教	細菌の侵入 に伴う細胞 応答解析	平成16年4月～ 平成20年3月
稲葉 裕明	大阪大学歯学研究 科口腔分子免疫制 御学講座	助教	細胞内侵入 に必要な細 菌因子の解 析	平成16年4月～ 平成19年8月
吉森真由美	大阪大学歯学研究 科口腔分子免疫制 御学講座	クレスト研 究補助員	研究支援 (実験補助・ 試薬調整)	平成16年9月～ 平成20年3月

5. 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
招聘研究者はおりません。			

6. 成果発表等

(1) 原著論文発表

吉森グループ(国内誌 0 件、国際誌 42 件)

- 1) Nara A, Mizushima N, Yamamoto A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T.
SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation
Cell Struct. Funct. 27, 29-37 (2002)
- 2) Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I.
The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy
J Biochem. 131, 647-651 (2002)
- 3) Ikonomov OC, Sbrissa D, Yoshimori T, Cover TL, Shisheva A.
PIKfyve kinase and SKD1 AAA ATPase define distinct endocytic compartments: only PIKfyve expression inhibits the cell-vacuolating activity of helicobacter pylori VacA toxin
J. Biol. Chem 277, 46785-46790 (2002)
- 4) Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y.
Mouse Apg10 as an Apg12 conjugating enzyme: Analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method
FEBS let. 532, 450-454 (2002)
- 5) Fujita H, Yamanaka M, Imamura K, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, Himeno M.
A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: Class E vps phenotype
J. Cell Sci. 116, 401-414 (2003)
- 6) Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T.
Mouse Apg16L, a Novel WD Repeat Protein, Targets to the Autophagic Isolation Membrane with the Apg12-Apg5 Conjugate
J. Cell Sci. 116, 1679-1688 (2003)
- 7) Saeki K, Hong Z, Nakatsu M, Yoshimori T, Kabeya Y, Yamamoto A, Kaburagi Y, You A.
Insulin-dependent signaling regulates azurophil granule-selective macroautophagy in human myeloblastic cells
J. Leukoc. Biol. 74, 1108-1116 (2003)
- 8) Ohashi M, Mizushima N, Kabeya Y, Yoshimori T.
Localization of Mammalian NAD(P)H Steroid Dehydrogenase-like Protein on Lipid Droplets
J. Biol. Chem. 278, 36819-36829 (2003)
- 9) Katoh K, Shibata H, Suzuki H, Nara A, Ishidoh K, Kominami E, Yoshimori T, Maki M.
The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting
J. Biol. Chem. 278, 39104-39113 (2003)
- 10) Kanazawa C, Morita E, Yamada M, Ishii N, Miura S, Asao H, Yoshimori T, Sugamura K.
Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation
Biochem. Biophys. Res. Commun. 309, 848-856 (2003)
- 11) Yamakami M, Yoshimori T, Yokosawa H.
Tom 1, a VHS domain-containing protein, interacts with Tollip, ubiquitin, and clathrin
J. Biol. Chem. 278, 52865-52872 (2003)
- 12) Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y.
In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker
Mol. Biol. Cell 15, 1101-1111 (2004)
- 13) Prentice E W, Jerome G, Yoshimori T, Mizushima N, Denison M R.
Coronavirus Replication Complex Formation Utilizes Components of Cellular Autophagy

- J. Biol. Chem. 279, 10136-10141(2004)
- 14) Kabeya Y, Mizushima N, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T.
LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation
J. Cell Sci. 117, 2805-2812 (2004)
 - 15) Fujita H, Umezaki Y, Imamura K, Ishikawa D, Uchimura S, Nara A, Yoshimori T, Hayashizaki Y, Kawai J, Ishidoh K, Tanaka Y, Himeno M.
Mammalian class E Vps proteins, SBP1 and mVps2/CHMP2A, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4B
J. Cell Sci. 117, 2997-3009 (2004)
 - 16) Birkeland H C G, Simonsen A, Gillooly D J, Mizushima N, Kuma A, Yoshimori T, Slagsvold T, Brech A, Stenmark H.
Alfy, a novel FYVE domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes
J. Cell. Sci. 117, 4239-4251 (2004)
 - 17) Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N.
Role of autophagy during the early neonatal starvation period
Nature 432, 1032- 1036 (2004)
 - 18) Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T.
Autophagy defenses cells against invading group A *Streptococcus*
Science 306, 1037-1040 (2004)
 - 19) Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C.
Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy
Science 307, 727-731 (2005)
 - 20) Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G.
Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis
Mol. Cell. Biol. 25, 1025-1040 (2005)
 - 21) Yamada T, Carson A R, Caniggia I, Umebayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K, Scherer S W.
Endothelial nitric oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast
J. Biol. Chem. 280, 18283-18290 (2005)
 - 22) Hoshino M, Yoshimori T, Nakamura S.
Small GTPase proteins Rin and Rit bind to Par6 GTP-dependently, and regulate cell transformation
J. Biol. Chem. 280, 22868-22874 (2005)
 - 23) Towns R, Kabeya Y, Yoshimori T, Guo C, Shanguan Y, Hong S, Kaplan M, Klionsky D J, Wiley J W.
Sera from patients with type 2 Diabetes and Neuropathy Induce Autophagy and Colocalization with Mitochondria in SY5Y cells
Autophagy 1, 163-170 (2005)
 - 24) Mizuno E, Iura T, Mukai A, Yoshimori T, Kitamura N, Komada M.
Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes
Mol Biol Cell. 16, 5163-5174 (2005)
 - 25) Egami Y, Kiryu-Seo S, Yoshimori T, Kiyama H.
Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons
Biochem Biophys Res Commun. 337, 1206-1213 (2005)
 - 26) Tsuda K, Amano A, Umebayashi K, Inaba H, Nakagawa I, Nakanishi Y, Yoshimori T.
Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle
Cell Struct. Funct. 30, 81-91 (2005)
 - 27) Kamimoto T, Shisako S, Hidvegi T, Mizushima N, Umebayashi K, Perlmutter D H, Yoshimori T.
Intracellular inclusions containing mutant α 1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity
J. Biol. Chem. 281, 4467-4476 (2006)
 - 28) Birmingham C L, Smith A C, Bakowski M A, Yoshimori T, Brumell J H.

- Autophagy Controls Salmonella Infection in Response to Damage to the Salmonella-containing Vacuole
J. Biol. Chem. 281, 11374–11383 (2006)
- 29) Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, Macdonald M, Yankner B, Yuan J.
 Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1
J. Biol. Chem. 281, 14474–14485 (2006)
- 30) Shim J H, Xiao C, Hayden M S, Lee K Y, Trombetta E S, Pypaert M, Nara A, Yoshimori T, Wilm B, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hogan B L, Mellman I, Ghosh S.
 CHMP5 is essential for late endosome function and down-regulation of receptor signaling during mouse embryogenesis
J. Cell Biol. 172, 1045–1056 (2006)
- 31) Nakashima A, Tanaka N, Tamai K, Kyuuma M, Ishikawa Y, Sato H, Yoshimori T, Saito S, Sugamura K.
 Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy
Virology. 349, 254–263 (2006)
- 32) Ohsaki Y, Sugimoto Y, Suzuki M, Hosokawa H, Yoshimori T, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H.
 Cholesterol depletion facilitates ubiquitylation of NPC1 and its association with SKD1/Vps4
J Cell Sci. 119, 2643–2653 (2006)
- 33) Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, Yoshimori T, Morris AP, Estes MK.
 Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm
J Virol. 80, 6061–6071 (2006)
- 34) Szeto J, Kaniuk NA, Canadien V, Nisman R, Mizushima N, Yoshimori T, Bazett-Jones DP, Brumell JH.
 ALIS are Stress-Induced Protein Storage Compartments for Substrates of the Proteasome and Autophagy
Autophagy 2, 189–199 (2006)
- 35) Arasaki K, Tani K, Yoshimori T, Stephens DJ, Tagaya M.
 Nordihydroguaiaretic acid affects multiple dynein-dynactin functions in interphase and mitotic cells
Mol Pharmacol. 71, 454–460 (2007).
- 36) Gutierrez MG, Saka HA, Chinen I, Zoppino FCM, Yoshimori T, Bocco JL, Colombo MI.
 Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*
Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 1829–1834 (2007)
- 37) Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, Elsassner HP, Schatzl HM.
 The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy
Leukemia. 21, 936–942 (2007)
- 38) Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin XM.
 Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability
Am J Pathol. 171, 513–524 (2007)
- 39) Tamai K, Tanaka N, Nara A, Yamamoto A, Nakagawa I, Yoshimori T, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K.
 Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells
Biochem Biophys Res Commun. 360, 721–727 (2007)
- 40) Kimura S, Noda T, Yoshimori T.
 Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3
Autophagy. 3, 452–460 (2007)
- 41) Uematsu S, Kaisho T, Tanaka T, Matsumoto M, Yamakami M, Omori H, Yamamoto M, Yoshimori T, Akira S.
 The C/EBP β isoform 34-kDa LAP is responsible for NF-IL-6-mediated gene induction in activated macrophages, but is not essential for intracellular bacteria killing
J Immunol. 179, 5378–5386 (2007)

- 42) Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y.
A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication
J Virol. (2008) Jan 23; [Epub ahead of print]

天野グループ(国内誌 0件、国際誌 44件)

- 1) Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I, Yamamura T, Kuboniwa M, Nakayama K, Hamada S, Amano A.
Porphyromonas gingivalis induces receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts through activator protein 1 pathway
Infect. Immun. 72, 1706-1714 (2004)
- 2) Kuboniwa M, Amano A, Kimura K. R, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S.
Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes
Oral Microbiol. Immunol. 19, 168-176 (2004)
- 3) Nakano K, Kuboniwa M, Nakagawa I, Yamamura T, Nomura R, Okahashi N, Ooshima T, Amano A.
Comparison of inflammatory changes by *Porphyromonas gingivalis* with distinct fimA genotypes in a mouse abscess model
Oral Microbiol. Immunol. 19, 205-209 (2004)
- 4) Huang DM, Zhou XD, Kuboniwa M, Amano A.
Separation of *Bacteroides forsythus* ATCC43037 proteins by horizontal two-dimensional gel electrophoresis
West China J Stomatol. 22, 177-179 (2004)
- 5) Huang DM, Zhou XD, Amano A.
Mechanism of interaction of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with *Bacteroides forsythus* surface proteins
Chinese J. Conser. Dentist. 14, 302-305 (2004)
- 6) Inaba H, Kawai S, Nakayama K, Okahashi N, Amano A.
Effect of enamel matrix derivative on periodontal ligament cells in vitro is diminished by *Porphyromonas gingivalis*
J. Periodontol. 75, 858-865 (2004)
- 7) Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T.
Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*
Science 306, 1037-1040 (2004)
- 8) Kawai S, Kato T, Inaba H, Okahashi N, Amano A.
Odd-skipped related 2 splicing variants show opposite transcriptional activity
Biochem. Biophys. Res. Commun. 328, 306-311 (2005)
- 9) Kato T, Amano A, Kamisaki Y, Morisaki I.
Enhancement of nifedipine-induced gingival overgrowth by concomitant ketoconazole in rats
Pharmacology 74, 45-50 (2005)
- 10) Ojima M, Takeda M, Yoshioka H, Nomura M, Tanaka N, Kato T, Shizukuishi S, Amano A.
Relationship of periodontal bacterium genotypic variations with periodontitis in type 2 diabetic patients
Diabetes Care 28, 433-434 (2005)
- 11) Nakagawa I, Amano A, Inaba H, Kawai S, Hamada S.
Inhibitory effects of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae on interactions between extracellular matrix proteins and cellular integrins
Microbe. Infect. 7, 157-163 (2005)
- 12) Tamura K, Nakano K, Nomura R, Miyake S, Nakagawa I, Amano A, Ooshima T.
Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Japanese children and adolescents
J. Periodontol. 76, 674-679 (2005)
- 13) Kato T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Morisaki I, Amano A.
Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the anti-epileptic drug phenytoin
J. Periodontol. 76, 941-950 (2005)
- 14) Inaba H, Tagashira M, Kanda T, Ohno T, Kawai S, Amano A.

- Apple- and hop-polyphenols protect periodontal ligament cells stimulated with enamel matrix derivative from *Porphyromonas gingivalis*
J. Periodontol. 76, 2223-2229 (2005)
- 15) Tsuda K, Amano A, Umebayashi K, Inaba H, Nakagawa I, Nakanishi Y, Yoshimori T.
Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle
Cell Struct. Funct., 30, 81-91(2005)
 - 16) Inaba H, Kawai S, Kato T, Nakagawa I, Amano A.
Association between epithelial cell death and invasion by microspheres conjugated to *Porphyromonas gingivalis* vesicles with different types of fimbriae
Infect. Immun. 74, 734-739 (2006)
 - 17) Akiyama S, Amano A, Kato T, Takada Y, Kimura KR, Morisaki I.
Relationship of periodontal bacteria and *Porphyromonas gingivalis fimA* variations with phenytoin-induced gingival overgrowth
Oral Dis. 12, 51-56 (2006)
 - 18) Takeda M, Ojima M, Yoshioka H, Inaba H, Kogo M, Shizukuishi S, Nomura M, Amano A.
Relationship of serum advanced glycation end products with deterioration of periodontitis in type 2 diabetes patients
J. Periodontol. 77, 15-20 (2006)
 - 19) Kawai S, Kato T, Sato M, Amano A.
Odd-skipped related 2 gene transcription is regulated by CCAAT enhancer-binding protein in mesenchymal C3H10T1/2 cells
Genes Cells. 11, 163-175 (2006)
 - 20) Kato T, Okahashi N, Ohno T, Inaba H, Kawai S, Amano A.
Effect of phenytoin on collagen accumulation by human gingival fibroblasts expose to TNF- α *in vitro*
Oral Dis. 12, 156-162 (2006)
 - 21) Ohno T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Shibata Y, Morisaki I, Abiko Y, Amano A.
Proinflammatory gene expression in mouse ST2 osteoblast/stromal cell line in response to infection by *Porphyromonas gingivalis*
Microbes Infect. 8, 1025-1034 (2006)
 - 22) Takemura A, Nakagawa I, Kawai S, Inaba H, Kato T, Hamada S, Amano A.
Inhibitory effects of tumor necrosis factor- α on migration of human periodontal ligament cells
J. Periodontol. 77, 883-890 (2006)
 - 23) Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A.
Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct fimbria types of *Porphyromonas gingivalis*
Infect. Immun. 74, 3773-3782 (2006).
 - 24) Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, Taniguchi K, Takeda M, Yoshioka H, Amano A, Ooshima T.
Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis
J. Med. Microbiol. 55, 1135-1140 (2006)
 - 25) Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, Matsue H, Takahashi T, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.
Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens
J. Clin. Microbiol. 44, 3313-3317 (2006)
 - 26) Amano A.
Oral microbiology research of Shigeyuki Hamada in the pre-genomic era
Journal of Dental Research 85(6),501-504(2006)
 - 27) Davila-Perez C, Amano A, Alpuche-Solis AG, Patiño-Marin N, Pontigo-Loyola AP, Hamada S, Loyola-Rodriguez JP.
Distribution of genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in type 2 diabetic patients with periodontitis in Mexico
J. Clin. Periodontol. 34, 25-30 (2007)
 - 28) Kato T, Kawai S, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Nakagawa I, Tsuda K, Omori H, Ooshima T, Yoshimori T, Amano A.
Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene

- with different genotype
Cell. Microbiol. 9, 753–765 (2007)
- 29) Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Tamura K, Miyamoto E, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.
Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in cardiovascular specimens from Japanese patients
Oral Microbiol. Immunol. 22, 136–139 (2007)
 - 30) Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Homma H, Yoshioka H, Shudo Y, Hata H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.
Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients
J. Med. Microbiol. 56, 551–556 (2007)
 - 31) Kato T, Tsuda T, Omori H, Kato T, Yoshimori T, Amano A.
Maturation of fimbria precursor protein by exogenous gingipains in *Porphyromonas gingivalis* gingipain-null mutant
FEMS Microbiol. Let. 273, 96–102 (2007)
 - 32) Kawai S, Yamauchi M, Wakisaka S, Ooshima T, Amano A.
Zinc-finger transcription factor *Odd-skipped related 2* is one of the regulators in osteoblast proliferation and bone formation
J. Bone Miner. Res. 22(9),1362–1372 (2007)
 - 33) Amano A.
Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*
Front Biosci.12, 3965–3974
 - 34) Inaba H, Nakano K, Kato T, Nomura R, Kawai S, Kuboniwa M, Ishihara K, Ooshima T, Amano A.
Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae
Oral Microbiol. Immunol. in press (2007)
 - 35) Ohno T, Okahashi N, Morisaki I, Amano A.
Signaling pathways in osteoblast proinflammatory responses to infection by *Porphyromonas gingivalis*
Oral Microbiol. Immunol. in press (2007)
 - 36) Kato T, Tsuda T, Kawai S, Inaba H, Okahashi N, Shibata Y, Abiko Y, Amano A.
Porphyromonas gingivalis gingipains cause G1 arrest in osteoblastic/stromal cells
Oral Microbiol. Immunol. in press (2007)
 - 37) Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Mukai T, Yoshioka H, Shudo Y, Hata H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.
Detection of novel serotype k *Streptococcus mutans* in infective endocarditis patients
J. Med. Microbiol. in press (2007)
 - 38) Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeuchi H, Yoshioka H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.
Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients
Oral Microbiol. Immunol. in press (2007)
 - 39) Makiura N, Ojima M, Kou Y, Furuta N, Okahashi N, Shizukuishi S, Amano A.
Persistence of *Porphyromonas gingivalis* causes deterioration of glycemic control in type 2 diabetic patients
Oral Microbiol. Immunol., in press (2008)
 - 40) Murakami J, Morisaki I, Tanaka T, Akiyama S, Amano A, Friedman SC.
Multiple dental caries in unerupted permanent teeth in a child with phenytoin-induced gingival overgrowth
J. Dis. Oral Healt. in press (2008)
 - 41) Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Amano A, Ooshima T.
Molecular interaction of alanine-rich and proline-rich regions of cell surface protein antigen PAc in *Streptococcus mutans*
Oral Microbiol. Immunol., in press (2008)
 - 42) Murakami J, Kato T, Kawai S, Akiyama S, Amano A, Morisaki I.
Cellular motility of Down syndrome gingival fibroblasts susceptible to impairment by *Porphyromonas gingivalis* invasion
J. Periodontol., in press (2008)

- 43) Kuboniwa M, Hasegawa Y, Mao S, Shizukuishi S, Amano A, Lamont RJ, Yilmaz Ö.
P. gingivalis accelerates gingival epithelial cell progression through the cell cycle
 Microbe. Infect., in press (2008)
- 44) Inaba H, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Kou Y, Ohtake Y, Amano A.
 Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E₂ production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen
 Biol. Pharmacol Bull., 31(3) (2008)

(2) その他の著作物

吉森グループ

- 1) 大橋 正人、吉森 保
 エンドソーム: 分子とシグナルを選別する変幻自在のオルガネラ
 細胞工学 21 866-876 (2002)
- 2) Yoshimori T.
 Toward and beyond lysosomes (preface for a review cluster)
 Cell Struct. Funct. 27, 401-402 (2002)
- 3) Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T.
 Autophagosome formation in mammalian cells
 Cell Struct. Funct. 27, 421-429 (2002)
- 4) 吉森 保
 オートファジー: 細胞質とリソソームを結ぶメインロード
 わかる実験医学シリーズ「細胞内輸送がわかる」米田悦啓編
 羊土社 96-101 (2002)
- 5) Yoshimori T, Mizushima N.
 Mammalian homologues of Yeast Autophagy Proteins
 Autophagy, Ed. Klionsky D. J., Eurekah.com, 204-210 (2003)
- 6) 吉森 保
 リソソーム/ゴルジ体/ペルオキシソーム/KDEL 配列/PDI/液胞型 H⁺-ATP アーゼ/カベオリン/共焦点顕微鏡/ラフト/レーザー共焦点顕微鏡
 分子生物学・免疫学キーワード辞典第2版 医学書院 (2003)
- 7) Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y.
 Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy
 Int. J. Biochem. Cell Biol. 35, 553-561 (2003)
- 8) 梅林恭平、吉森 保
 エンドサイトーシス経路における分子選別 - 輸送シグナルとしてのユビキチン -
 実験医学増刊 21 1986-1990 (2003)
- 9) 吉森 保
 哺乳動物のオートファジー: 分子機構と生理機能
 生体の科学 54 514-520 (2003)
- 10) Yoshimori T.
 Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 313, 453-458 (2004)
- 11) 吉森 保
 蛋白質大規模分解システムとしてのオートファジー: 明らかになってきた多彩な生理機能
 蛋白質核酸酵素増刊号「細胞における蛋白質の一生」49 1029-1032 (2004)
- 12) 吉森 保
 オートファジーと疾患
 医学のあゆみ 211 147-151 (2004)
- 13) 吉森 保
 病原性細菌・ウイルス vs. オートファジー
 細胞工学 24 572-576 (2005)
- 14) 吉森 保
 ベールを脱ぐオートファジー
 現代化学 7月号 46-51 (2005)
- 15) 星野光伸、吉森 保
 オートファジーの最新事情 - その生理的機能に迫る
 実験医学 23 2371-2376 (2005)
- 16) 山口ひとみ、吉森 保
 オートファジーによる宿主防御

- 蛋白質核酸酵素 51 125-130 (2006)
- 17) 吉森 保
細菌感染とオートファジー
医学のあゆみ 216 521-524 (2006)
 - 18) 木村俊介、神本高弘、吉森 保
オートファジーとフォールディング病
蛋白質核酸酵素 51 1494-1498 (2006)
 - 19) 中川一路、吉森 保
感染防御機構としてのオートファジー
蛋白質核酸酵素 51 1507-1514 (2006)
 - 20) Yoshimori T.
Autophagy vs. Group A Streptococcus
Autophagy 2, 154-155 (2006)
 - 21) 木村俊介、吉森 保
オートファゴソーム移動の分子機構と意義
細胞工学 25(11)1273-1279(2006)
 - 22) Yoshimori T.
Autophagy: Paying Charon's Toll
Cell 128, 833-836 (2007)
 - 23) Mizushima N, Yoshimori T.
How to Interpret LC3 Immunoblotting
Autophagy 2007 Jun 19, 3(6)
 - 24) 吉森 保
リソソームへの輸送
生化学辞典(第4版)東京化学同人

天野グループ

- 1) Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N.
Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis
J. Periodont. Res. 39, 136-142 (2004)
- 2) 天野敦雄
歯周病細菌の遺伝子多型の歯周病原性との関連
食生活科学文化及び地球環境科学に関する研究紀要 アサヒビール学術振興財団 17, 49-53 (2004)
- 3) 天野敦雄, 岡橋暢夫, 稲葉裕明, 河合伸治
歯周病細菌の細胞障害戦略
フロンティアバイオデンティストリー 先端歯科医学の創生 大阪大学出版会 82-90 (2005)
- 4) Amano A.
Oral microbiology research of Shigeyuki Hamada in the pre-genomic era
J. Dent. Res. 85, 501-504 (2006)
- 5) Amano A, Nakagawa I, Yoshimori T.
Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria
J. Biochem. (Tokyo) 140, 161-166 (2006)
- 6) Amano A, Yoshimori T.
Autophagy eliminates Group A *Streptococcus* invading host cells
Autophagy in Immunity and Infection: A Novel Immune Effector, Ed. Deretic V., WILEY-VCH, 139-150 (2006)
- 7) 天野敦雄, 津田香代子, 吉森 保
歯周病感染とメンブレントラフィック
実験医学 24, 2110-2115 (2006)
- 8) 天野敦雄, 河合伸治
糖尿病と歯科骨粗鬆症
CLINICAL CALCIUM 17, 186-191 (2007)

(3) 学会発表

①招待講演

吉森グループ(国内会議 45件、国際会議 15件)

- 1) 吉森 保
Analysis of autophagy, an intracellular bulk degradation system: from molecular machinery to physiological roles
細胞生物シンポジウム 1 ポストゴルジ・ネットワーク ～その個体・高次機能における役割～第 55 回日本細胞生物学会大会、横浜 (2002)
- 2) Yoshimori T.
Molecular basis of membrane dynamics in mammalian autophagy: studies on mammalian homologues of yeast autophagic proteins
III international symposium on Autophagy “Molecular Biology and Pathophysiology of the Lysosomal/Vacuolar System” in Osaka 大阪 (2002)
- 3) 吉森 保
リソソームへ！ ～細胞内物質分解を制御するメンブレン・トラフィック～
シンポジウム 4S73 リソソーム・ネットワーク
第 75 回日本生化学会大会、京都 (2002)
- 4) 吉森 保
特別講演 リソソームネットワーク リソソームを中心とした細胞内膜構造間の連携
第 16 回日本色素細胞学会年次学術大会 名古屋 (2002)
- 5) 吉森 保
Autophagy: an intracellular bulk degradation system regulated by amino acids
Conference on Patho-Physiological aspects of BCAA 東京 (2003)
- 6) 吉森 保
細胞の自己分解システムを担うオートファゴソームの形成
シンポジウム S16 細胞における微小領域の構築機構
第 108 回日本解剖学会全国学術集会 福岡 (2003)
- 7) 吉森 保
リソソームへの道: エンドソーム系とオートファジーの分子機構と生理機能
シンポジウム
平成 15 年度日本生化学会九州支部例会 福岡 (2003)
- 8) Yoshimori T.
Role of SKD1 in endosomal membrane trafficking
The Fifth International Meeting on AAA Proteins in Warrenton, VA, USA, June 15-19 (2003)
- 9) Yoshimori T.
Role of Mammalian Apg Genes in Protein Misfolding Diseases and Bacterial Invasion into Cells
Gordon Research Conference in Waterville, Maine, USA, June 22-27 (2003)
(2003.7.10)
- 10) 吉森 保
哺乳類の分解オルガネラ・リソソームへの輸送システム ～エンドソーム系とオートファジー～
シンポジウム 3 真核生物における有機化合物の輸送機能と生理
第 21 回日本植物細胞分子生物学会 高松 (2003.8.7-8)
- 11) 吉森 保
メンブレントラフィック ～分子機構から高次機能への展開～
厚生労働省・精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」班 Small group workshop 東京 (2003.10.24)
- 12) 吉森 保
リソソームへのメンブレントラフィック: 疾患における役割
文部科学省・科学研究費補助金・特定領域研究「蛋白質分解-新しいモディファイアー蛋白質による制御」平成 15 年度第 4 回公開シンポジウム「蛋白質分解のメカニズムとバイオロジー」 岡崎 (2003.12.19-20)
- 13) 吉森 保
The Long and Winding Roads to Lysosomes: オートファジーとエンドソーム系の分子機構、疾患との関わり
京都大学再生医科学研究所 第 120 回細胞生物学セミナー (2004.3.23)
- 14) 吉森 保
New insights into molecular mechanisms and roles of autophagy
Symposium 7: Sorting and Selection in Membrane Trafficking
第 57 回日本細胞生物学会大会、大阪 (2004.5.26-28)
- 15) 吉森 保
オートファジーと疾患
第 9 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会・ワークショップ「オ

- オートファジーのメカニズムとパソロジー」名古屋 (2004.7.30-31)
- 16) Yoshimori T.
New insights into molecular mechanisms of autophagy and its role in diseases
The invited seminar in Geneva University Sciences II in Geneva, Switzerland
(2004.9.10)
 - 17) 吉森 保
たんぱく質と膜が造る細胞内物流システム
科学技術振興機構 2004 年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム 東京
(2004.12.22-23)
 - 18) Yoshimori T.
Role of Autophagy in diseases
International Symposium on “Membrane Traffic” in Kyoto, Japan.
(2005.2.2-3)
 - 19) 吉森 保
オートファジー ～分子機構と疾患における役割～
京都大学ウイルス研究所コロキウム「膜輸送研究の新展開」
(2005.2.14-15)
 - 20) 吉森 保
細胞が自らを食べる仕組み・オートファジー ～分子機構と疾患との関わり～
七隈アルツハイマー研究会カンファレンス 特別講演 福岡 (2005.3.12)
 - 21) Yoshimori T.
Regulatory mechanisms of autophagosome formation
Gordon Research Conference “Autophagy In Stress, Development And Disease”
in Il Ciocco
Barga, Italy, April 24-29 (2005)
 - 22) Yoshimori T.
Autophagy unveiled: its molecular machinery and physiological role
The invited seminar in Max Planck Institute for Infection Biology in Berlin,
Germany (2005.5.2)
 - 23) 吉森 保
病原体 vs. オートファジー ～細胞の自己成分分解システムによる細胞内病原体
排除～
第14回東京免疫フォーラム 東京 (2005.5.10)
 - 24) 吉森 保
ベールを脱ぐオートファジー ～分子機構と疾患との関わり～
微研セミナー 大阪大学微生物病研究所 (2005.5.16)
 - 25) Yoshimori T.
Autophagy Unveiled: Molecular Machinery and Role in Diseases
RCAI Seminar 理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター
(2005.6.2)
 - 26) 吉森 保
ベールを脱ぐオートファジー ～分子機構と疾患との関わり～
東北大学医学系研究科・21 世紀 COE プログラム「シグナル伝達病の治療戦略
創生拠点」第2回若手研究交流会 特別講演 宮城県松島町 (2005.7.1)
 - 27) Yoshimori T.
Autophagy unveiled: its molecular machinery and role in diseases
The invited seminar in Department of Cellular and Physiological Sciences,
University of British Columbia in Vancouver, Canada (2005.7.20)
 - 28) Yoshimori T.
Autophagy unveiled: its molecular machinery and role in diseases
The invited lecture for Research Institute Seminar Series at The Hospital For
Sick Children in Toronto, Canada (2005.7.22)
 - 29) 吉森 保
オートファジー ～「自分を食べるシステム」が細胞を守る～
第17回高遠・分子細胞生物学シンポジウム「細胞生物学のカッティングエッジ」
長野県伊那郡高遠町 (2005.8.18-19)
 - 30) Yoshimori T.
Autophagy unveiled: its molecular basis and role in diseases
The Awaji international forum on infection and immunity (第5回あわじしま感染
症・免疫フォーラム) 兵庫県淡路市 (2005.9.5-8)
 - 31) Yoshimori T.
Autophagy against uninvited guests in cells: cases of group A *Streptococcus*
and aggregate-prone proteins

- Symposia S2 Autophagy unveiled: defense and survival by self-eating
第78回日本生化学会大会 神戸 (2005.10.19-22)
- 32) Yoshimori T.
Autophagy against invading bacteria and aggregate-prone proteins
International Symposium on Life of Proteins ~ Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell ~ 兵庫県淡路市 (2005.10.30-11.3)
- 33) 吉森 保
たんぱく質と膜が造る細胞内物流システム
科学技術振興機構 2005年度“たんぱく質関連領域”合同シンポジウム 大阪
(2005.11.15-16)
(2005.11.28-29)
- 34) 吉森 保
生命を守る細胞内の膜ダイナミクス・オートファジー
国立感染症研究所学友会シンポジウム「新たなる生命科学への挑戦—イメージング技術」(2005.12.22)
- 35) 吉森 保
微生物による感染を防いでいます
文部科学省特定領域研究・たんぱく質分解・第6回公開シンポジウム(順天堂大学都民公開講座)「いきいきとした細胞、そして健康を保つために—タンパク質分解の重要性—」(2005.12.24)
- 36) Yoshimori T.
Autophagy against unwelcome guests in cells, invading bacteria and aggregate-prone proteins
AASLD/Alpha-1 Single Topic Conference “Alpha-1 Antitrypsin Deficiency and Other Liver Diseases Caused by Aggregated Proteins” in Atlanta, Georgia, U.S.A. (2006.1.26-28)
(2006.2.9-10)
- 37) 吉森 保
オートファジーによる細胞内侵入細菌の除去
日本薬学会第126年会 シンポジウム:自然免疫における液性応答と細胞性応答 仙台 (2006.3.28)
- 38) Yoshimori T.
Winners and Losers: Autophagy of *Shigella* and Group A *Streptococcus*
American Society for Microbiology 106th General Meeting, Colloquium on “Autophagy in Infection and Immunity” in Orlando, Florida, U.S.A. (2006.5.23)
- 39) Yoshimori T.
Autophagy: molecular machinery and roles in diseases
The Joint Symposium of the Institute for Virus Research, Kyoto University 50th Anniversary Symposium and the 2nd International Symposium of Institutes Network on “Revisiting Life Science from Half Century of Virus Research” in Kyoto (2006.5.30)
- 40) Yoshimori T.
Autophagy: new insights into its dynamics and role in diseases
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Symposium on “Membrane traffic: Physiology and diseases” in Kyoto (2006.6.21)
- 41) Yoshimori T.
Role of autophagy in diseases
International Symposium on “Medical and Biological Perspectives in Proteases and Their Inhibitors” (Satellite Meeting of 20th IUBMB International Congress and 11th FAOBMB Congress) in Awaji-Shima (2006.6.26)
- 42) 吉森 保
セルの中をのぞくと、まるで町みたい！
「セルフ festa 2006 in 大阪」講演会 めざせノーベル賞！セルから見た世界—世界を代表する研究者に直接インタビュー (2006.8.7)(主催:日本学術会議 科学と社会委員会 科学力増進分科会、共催:科学技術振興機構、協力:日本科学未来館、後援:大阪府教育委員会、日本細胞生物学会)
- 43) Yoshimori T.
Autophagy in diseases (FEBS Special Lecture)
EMBO Conference Series with support from ESF and FEBS “Interface of Cell Biology and Cellular Microbiology; Macromolecular Complexes in Microbial Pathogenesis, Membrane Trafficking and Cell Signalling” in Sant Feliu de Guixols, Spain (2006.9.23-28)

- 44) Yoshimori T.
New insight into mechanism of autophagy against invasive bacteria and aggregate-prone proteins
4th International Symposium on Autophagy: Exploring the Frontiers of Autophagy Research in Mishima (2006.10.1-5)
- 45) Kimura S, Yamaguchi H, Yoshimori T.
New Insight into Mechanism of Autophagy against Invasive Bacteria and Aggregate-prone Proteins
Osaka University and IFR Symposium in Paris, France (2006.10.20-21)
- 46) 吉森 保
感染症、変性疾患とオートファジー
千里ライフサイエンスセミナー「オートファジーによる細胞内自己消化:分子機構から生理機能へ」大阪 (2006.11.13)
- 47) 吉森 保
オートファジー:生体防御にも働く細胞内自己分解システム
日本免疫学会総会・学術集会 異分野セミナー 大阪 (2006.12.13)
- 48) 吉森 保
オートファジーの分子機構と生体防御機能
微研冬の学校 兵庫県ハチ北高原(2007.2.16)
- 49) Yoshimori T.
New insight into Molecular Mechanisms of the Canonical and Specialized Autophagy
Keystone Symposia on “Autophagy in Health and Disease” in Monterey, California, U.S.A.(2007.4.15-20)
- 50) 吉森 保
生体防御とオートファジー
第18回日本生体防御学会学術総会特別講演 福岡(2007.7.26)
- 51) Yoshimori T.
Autophagy as a cellular guardian against bacteria and aggregate-prone proteins
ELSO conference 2007, Subgroup meeting one-Autophagy in Dresden, Germany (2007.9.1-4)
- 52) Yoshimori T.
Autophagy: new insights into its molecular machinery and functions
The invited seminar in Institute of Molecular and Cell Biology in Singapore (2007.9.12)
- 53) 吉森 保
生体防御機構としてのオートファジー:細菌感染とフォールディング病
文科省科研費特定領域研究「タンパク質分解による細胞・個体機能の制御」公開シンポジウム「オートファジー:病態に迫る!」東京 (2007.9.22)
- 54) 吉森 保
オートファジー:生体防御にも働く細胞内自己消化システム
家畜DNA西郷シンポジウム 福島県西白河郡 (2007.10.2)
- 55) Yoshimori T.
Autophagy: Molecular Machinery and Role in Cellular Defense
The 20th Naito Conference on “Innate Immunity in Medicine and Biology III” in Kanagawa, Japan (2007.10.9-12)
- 56) 吉森 保
オートファジー:分子機構と疾患における役割 大阪大学21世紀COE「疾患関連糖鎖・タンパク質の統合的機能解析」若手セミナー 大阪大学医学部 (2007.10.24)
- 57) 吉森 保
たんぱく質と膜が造る細胞内物流システム 科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業(CREST)研究領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」平成14年度採択課題終了シンポジウム 東京 (2007.11.15)
- 58) Yoshimori T.
Membrane Dynamics and Cellular Defense Function of Autophagy
Internatinal Symposium on Membrane Traffic in Awajishima, Japan (2007.11.27-29)
- 59) Yoshimori T.
Autophagy as A Cellular Defense System
2007 International RIMD-CVRDC Joint Symposium in Osaka, Japan (2007.12.18)
- 60) Yoshimori T.

Where they come from?: Mechanistic insight into autophagosome formation in mammals
Gordon Research Conference “Autophagy In Stress, Development And Disease”
in Ventura, CA, USA (2008.1.6-11)

天野グループ(国内会議 10 件、国際会議 2 件)

- 1) 天野敦雄
歯周病原細菌の侵入と宿主細胞の分子レベルの応答「*P. gingivalis* 付着・侵入の標的となる宿主シグナル伝達因子」
第 77 回日本細菌学会総会, 大阪(2004.4.3)
- 2) 天野敦雄
長寿を支える歯の健康
大阪大学中之島センター竣工記念講演会, 大阪(2004.4.29).
- 3) 天野敦雄
細胞内侵入性細菌に対する細胞内認識システムとオートファジー誘導の解析
文部科学省・科学研究費補助金・特定領域研究「メンブレントラフィックー分子機構から高次機能への展開 ー」平成 16 年度班会議, 山梨県(2004.9.29)
- 4) Amano A.
Starategy of *Porphyromonas gingivalis* for periodontal destruction
The 6th Chinese National and International Conference on Caries and Oral Microbiology, Chendu (成都), China(2005.9.21)
- 5) 天野敦雄
P. gingivalis の細胞傷害機構の解明に向けた最新研究動向
第 47 回歯科基礎医学学会学術大会, 仙台(2005.9.29)
- 6) 天野敦雄
細胞内侵入性細菌に対する細胞内認識システムとオートファジー誘導の解析
文部科学省・科学研究費補助金・特定領域研究「メンブレントラフィックー分子機構から高次機能への展開 ー」平成 17 年度班会議, 群馬県(2005.11.18)
- 7) 天野敦雄
Porphyromonas gingivalis の細胞傷害機構
COE オープンシンポジウム 2005「細菌と宿主の攻防に迫る」, 大阪(2005.12.3)
- 8) 天野敦雄
病原性細菌侵入への細胞応答
公開シンポジウム「メンブレントラフィックと感染・免疫」, 東京(2005.12.21)
- 9) 天野敦雄
口と人生
河内長野市歯科医師会講演会, 大阪(2006.10.14)
- 10) 中川一路, 天野敦雄
オートファゴソーム形成を誘導する細菌因子・細胞因子の探索
文部科学省・科学研究費補助金・特定領域研究「メンブレントラフィックー分子機構から高次機能への展開 ー」平成 18 年度班会議, 香川県(2006.11.24)
- 11) Amano A.
Molecular interaction between periodontal bacteria and gingival epithelial cells
Egypt - Japan Scientific Collaboration Conference, Alexandria, Egypt (2007.5.31)
- 12) 天野敦雄
P. gingivalis II 型線毛株の細胞傷害性
文部科学省「学術フロンティア」平成 19 年度班会議, 千葉県松戸市(2007.8.17)

②口頭発表

吉森グループ (該当なし)

天野グループ(国内会議 7 件、国際会議 2 件)

- 1) 竹田宗弘, 吉岡秀郎, 嵩龍一, 大橋誠, 野村誠, 宇津貴, 鎌田武信, 天野敦雄
2型糖尿病患者における歯周炎と *Porphyromonas gingivalis* 線毛遺伝子多型との関連
第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京(2004.5.14)
- 2) 河合伸治, 岡橋暢夫, 天野敦雄
マウス Odd-skipped related 2 遺伝子発現調節領域の解析

- 第 22 回日本骨代謝学会学術集会、大阪(2004.8.5)
- 3) 河合伸治, 加藤隆大, 稲葉裕明, 岡橋暢夫, 天野敦雄
転写因子 C/EBP δ による Odd-skipped related 2 遺伝子の発現制御
第 27 回日本分子生物学会年会(2004.12.10)
 - 4) 河合伸治, 天野敦雄
ドミナントネガティブ型 Odd-skipped related 2 トランスジェニックマウスは頭蓋骨形成が遅延する
第 23 回日本骨代謝学会学術集会,大阪(2005.7.23)
 - 5) Kawai S, Yoneda T, Amano A.
Dominant-negative Odd-skipped related 2 impaired parietal bone formation
27th Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research,
Nashville, USA (2005.9.27)
 - 6) 田頭素行, 稲葉裕明, 神田智正, 大竹康之, 天野敦雄
ホップポリフェノールは歯根膜細胞再生時の *P. gingivalis* 感染による傷害性を抑制する
第 6 回日本抗加齢医学会総会(2006.5.19)
 - 7) 河合伸治, 山内理司, 天野敦雄
ドミナントネガティブ型 Odd-skipped related 2 トランスジェニックマウスにおける骨格形成異常
第 24 回日本骨代謝学会学術集会(2006.7.7)
 - 8) Kawai S, Yamauchi S, Amano A.
Abnormal periosteal bone formation in transgenic mice expressing
dominant-negative Odd-skipped related 2
28th Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research
(2006.9.17)
 - 9) 河合伸治, 山内理司, 稲葉裕明, 天野敦雄
骨形成における Odd-skipped related 2 の役割
大阪大学歯学会 第 103 回例会及び第 53 回総会(2006.11.9)

③ポスター発表

吉森グループ(国内会議 17 件、国際会議 9 件)

- 1) 梅林恭平
Cargo ubiquitination in endosomes implicated by localization of an E3 ligase
第 57 回日本細胞生物学会(2004.5.26)
- 2) Yoshimori T.
New insights into molecular mechanisms of autophagy and its role in diseases
ELSO-European LifeScientist Organization(2004.9.4-8)
- 3) Yamakami M, Yoshimori T.
Tom1, a VHS Domain-containing Protein, Interacts with Tollip, Ubiquitin, and Clathrin
ELSO-European LifeScientist Organization(2004.9.4-8)
- 4) Yoshimori T.
Autophagic Machinery Provides a Cellular Defense System Against Invasion by a Pathogenic Bacteria, Group A Streptococcus
アメリカ細胞生物学会2004年大会(2004.12.6)
- 5) Yamaguchi H, Nakagawa I, Yamamoto A, Umebayashi K, Mizushima N, Yamada T, Nakabayashi K, Stephen W Scherer, Ohmori H, Suzuki E, Yoshimori T.
Membrane dynamics in autophagic elimination of bacteria, 2005 Gordon Research Conference Autophagy In Stress, Development And Disease, 51, Ciocco Barga Italy(2005.4.24-29)
- 6) 神本高宏, 吉森保
The Intracellular Inclusions Containing Mutant alpha1-Antitrypsin Z Are Propagated in the Absence of Autophagic Activity
第58回日本細胞生物学会大会(2005.6.15)
- 7) Umebayashi K.
Cargo ubiquitination in endosomes implicated by localization of the Cbl E3 ligase
Joint EMBO-FEBS-ESF Workshop on Membrane Dynamics in Endocytosis
Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols (Costa Brava), Spain(2005.9.17-22)
- 8) Umebayashi K, Harald Stenmark, Yoshimori T.
Receptor ubiquitination along the endocytic pathway: regulation by SKD1/Vps4

- 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, in Kyoto (2006.6.20)
- 9) Kimura S, Yoshimori T.
Analysis of autophagosome movement
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, in Kyoto (2006.6.22)
 - 10) Yamaguchi H, Yoshimori T.
Membrane dynamics during autophagic elimination of intracellular bacteria
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, in Kyoto (2006.6.23)
 - 11) Kimura S, Yoshimori T.
Analysis of autophagosome movement
4th International Symposium on Autophagy: Exploring the Frontiers of Autophagy Research in Mishima (2006.10.1-5)
 - 12) Umebayashi K, Harald Stenmark, Yoshimori T.
Receptor ubiquitination along the endocytic pathway: regulation by SKD1/Vps4
The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting, in San Diego, California, U.S.A. (2006.12.9-13)
 - 13) Umebayashi K, Yoshimori T.
Lipid- and ubiquitin-dependent protein sorting in endosomes
Japan-Switzerland 2nd Joint Seminar "Synthesis and Trafficking of glycolipids and glycolipid-anchored proteins", in Tsukuba (2007.1.30 - 2.2)
 - 14) Matsunaga K, Ichimura T, Isobe T, Noda T, Yoshimori T.
Characterization and functional analysis of Beclin-hVps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes in mammalian cells
第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会(2007.5.29)
 - 15) 木村俊介、吉森保
オートファゴソーム移動の分子機構と意義
第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会(2007.5.30)
 - 16) 田口奈緒子、吉森保、野田健司
オートファジーにおけるホスファチジルイノシトール脱リン酸化酵素の役割
酵母遺伝学フォーラム(大阪)第 40 回研究報告会(2007.9.11-13)
 - 17) Umebayashi K, Harald Stenmark, Yoshimori T.
Ubc4/5 and c-Cbl cooperate along the endocytic pathway to remodel ubiquitin moieties of EGF receptor
Workshop on Endocytic Systems: Mechanism and Function
Villars-sur-Ollon, Switzerland(2007.9.18-23)
 - 18) Kimura S, Noda T, Yoshimori T.
Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3
第 20 回内藤コンファレンス(2007.10.11)
 - 19) Umebayashi K, Harald Stenmark, Yoshimori T.
Ubc4/5 and c-Cbl continue to ubiquitinate EGF receptor after internalization to elongate polyubiquitin chains and counteract rapid deubiquitination
国際シンポジウム「メンブレントラフィック」淡路島(2007.11.27-29)
 - 20) 松永耕一、市村徹、磯辺俊明、野田健司、吉森保
Beclin-hVps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagic and endocytic pathways
国際シンポジウム「メンブレントラフィック」淡路島(2007.11.27-29)
 - 21) 木村俊介、野田健司、吉森保
Dynein-dependent Movement of Autophagosomes Mediates the Efficient Encounter with Lysosomes
第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007.12.13)
 - 22) 松永耕一、市村徹、磯辺俊明、野田健司、吉森保
Beclin-hVps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagic and endocytic pathways
第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007.12.13)
 - 23) 藤田尚信、野田健司、吉森保
Atg12-Atg5/Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation to form autophagosome

- 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会
(2007.12.13)
- 24) 田口奈緒子、吉森保、野田健司
ホスファチジルイノシトール脱リン酸化酵素はオートファジーの進行に関与する
第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会
(2007.12.13)
- 25) Matsunaga K, Ichimura T, Isobe T, Noda T, Yoshimori T.
Beclin-hVps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in
autophagic and endocytic pathways
Gordon Research Conference “Autophagy In Stress, Development And
Disease” in Ventura, CA, USA (2008. 1. 6-11)
- 26) Fujita N, Noda T, Yoshimori T.
Atg12-Atg5/Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for
Membrane Biogenesis in Autophagy
Gordon Research Conference “Autophagy In Stress, Development And
Disease” in Ventura, CA, USA (2008. 1. 6-11)

天野グループ(国内会議 32 件、国際会議 11 件)

- 1) 岡橋暢夫, 久保庭雅恵, 中川一路, 中山浩次, 天野敦雄
P. gingivalis のプロテアーゼが骨芽細胞の RANKL 発現に果たす役割
第 77 回日本細菌学会総会, 平成 16 年(2004 年)4 月 1 日(大阪市)
- 2) Murakami J, Kimura RK, Amano A, Morisaki I.
Prevalence of drug-induced gingival overgrowth in individuals taking
antiepileptic drugs at a dental clinic for patients with special needs
17th Congress of the International Association for Disability and Oral Health,
2004/8/25 (Calgary, Canada)
- 3) Kimura RK, Murakami J, Akiyama S, Amano A, Morisaki I.
Invasion of *Porphyromonas gingivalis* into gingival cells derived from Down
syndrome
17th Congress of the International Association for Disability and Oral Health,
2004/8/25 (Calgary, Canada)
- 4) 村上旬平, 木村敬次, 秋山茂久, 天野敦雄, 森崎市治郎
ダウン症候群歯肉上皮細胞および線維芽細胞への歯周病原細菌の付着・侵入
第 20 回日本歯科医学会総会, 平成 16 年(2004 年)10 月 30 日(横浜市)
- 5) 秋山茂久, 村上旬平, 天野敦雄, 森崎市治郎
てんかん患者における服用抗てんかん薬の種類, 歯肉肥大の発現状況と細菌学
的検討
第 20 回日本歯科医学会総会, 平成 16 年(2004 年)10 月 31 日(横浜市)
- 6) 村上旬平, 岡田直子, 堤香奈子, 加藤隆大, 稲葉裕明, 秋山茂久, 天野敦雄,
森崎市治郎
ダウン症候群歯肉線維芽細胞の歯周病原細菌に対する易感染性
第 21 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 16 年(2004 年)11 月 13 日(大阪
府)
- 7) 天野敦雄, 秋山茂久, 村上旬平, 稲葉裕明, 森崎市治郎
2型糖尿病に合併する歯周炎の発症・進行に関連する因子
第 21 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 16 年(2004 年)11 月 13 日(大阪
府)
- 8) 河合伸治, 加藤隆大, 稲葉裕明, 岡橋暢夫, 天野敦雄
転写因子 C/EBP δ による Odd-skipped related 2 遺伝子の発現制御
第 27 回日本分子生物学会年会, 平成 16 年(2004 年)12 月 10 日(神戸市)
- 9) Inaba H, Tagashira M, Kanda T, Amano A.
Hop- and apple-polyphenols protect Emdogain-stimulated PDL cells from
periodontopathogen
83rd General session of the IADR, 2005/6/ 9-12 (Baltimore, USA)
- 10) 大野貴志, 岡橋暢夫, 天野敦雄
P. gingivalis 感染により活性化される骨芽細胞の炎症応答遺伝子の解析
第 78 回日本細菌学会総会, 平成 17 年(2005 年)4 月 5 日(東京都)
- 11) 岡橋暢夫, 大野貴志, 中山浩次, 安孫子宣光, 天野敦雄
P. gingivalis 感染骨芽細胞におけるグローバルな遺伝子発現変化
第 78 回日本細菌学会総会, 平成 17 年(2005 年)4 月 5 日(東京都)
- 12) 稲葉裕明, 竹田宗弘, 天野敦雄
P. gingivalis 線毛遺伝子 (*fimA*) 型の上皮細胞侵入性・傷害性への影響

- 第 48 回日本歯周病学会学術大会, 平成 17 年 9 月 22 日 (札幌市)
- 13) 田頭素行, 稲葉裕明, 神田智正, 大竹康之, 天野敦雄
 エムドゲイン処理した歯根膜細胞への *P. gingivalis* の傷害性とホップ・アップルポリフェノールの保護作用
 第 48 回日本歯周病学会学術大会, 平成 17 年 9 月 22 日 (札幌市)
- 14) 竹田宗弘, 小島美樹, 稲葉裕明, 零石 聰, 天野敦雄
 2型糖尿病に併発する歯周炎の進行に関連する因子
 第 48 回日本歯周病学会学術大会, 平成 17 年 9 月 22 日 (札幌市)
- 15) 加藤隆大, 中川一路, 稲葉裕明, 河合伸治, 天野敦雄
 異なる線毛遺伝子型への形質転換による *Porphyromonas gingivalis* のウイルスレンス変化
 第 47 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 17 年(2005 年)9 月 29 日 (仙台市)
 微生物学部門・最優秀ポスター発表賞
- 16) 稲葉裕明, 加藤隆大, 河合伸治, 中川一路, 天野敦雄
P. gingivalis の細胞傷害性と線毛遺伝子多型との関連
 第 47 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 17 年(2005 年)9 月 29 日 (仙台市)
- 17) 天野敦雄, 加藤隆大, 稲葉裕明, 秋山茂久, 森崎市治郎
 フェニトイン刺激された歯肉線維芽細胞のコラーゲン代謝に及ぼす TNF- α の影響
 第 22 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 17 年(2005 年)10 月 15 日 (山梨県)
- 18) 加藤隆大, 稲葉裕明, 秋山茂久, 森崎市治郎, 天野敦雄
 線毛遺伝子型の形質転換により変化する *Porphyromonas gingivalis* の病原性
 第 22 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 17 年(2005 年)10 月 15 日 (山梨県)
- 19) 村上旬平, 木村敬次リチャード, 秋山茂久, 天野敦雄, 森崎市治郎
 ダウン症候群歯肉線維芽細胞の組織修復活性
 第 22 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 17 年(2005 年)10 月 15 日 (山梨県)
- 20) 大野貴志, 加藤隆大, 稲葉裕明, 森崎市治郎, 天野敦雄
P. gingivalis 感染による骨芽細胞の遺伝子発現変化
 第 22 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 17 年(2005 年)10 月 16 日 (山梨県)
- 21) 上崎善規, 加藤隆大, 和田孝一郎, 天野敦雄, 森崎市治郎
 ニフェジピンによる歯肉肥大に対するケトコナゾール併用の影響
 第 26 回日本臨床薬理学会, 平成 17 年(2005 年)12 月 2 日 (別府市)
- 22) 田頭素行, 稲葉裕明, 神田智正, 大竹康之, 天野敦雄
 ホップポリフェノールは歯根膜細胞再生時の *P. gingivalis* 感染による傷害性を抑制する
 第 6 回日本抗加齢医学会総会, 平成 18 年(2006 年)5 月 19 日 (東京都)
- 23) Amano A, Kato T, Inaba H, Kawai S Nakagawa I.
 Cellular impairment by distinct fimbria types of *P. gingivalis*
 84th General session of the IADR, 2006/6/ 28 (Brisbane, Australia)
- 24) Kato T, Kawai S, Amano A.
 Substitution of the *fimA* gene with different genotype of *Porphyromonas gingivalis*
 84th General session of the IADR, 2006/6/ 28 (Brisbane, Australia)
- 25) Kawai S, Amano A.
 Odd-skipped related 2 functions in parietal osteoblastic cells
 84th General session of the IADR, 2006/6/ 30 (Brisbane, Australia)
- 26) 河合伸治, 山内理司, 天野敦雄
 ドミナントネガティブ型 *Odd-skipped related 2* トランスジェニックマウスにおける骨格形成異常
 第 24 回日本骨代謝学会学術集会, 平成 18 年(2006 年)7 月 7 日 (東京都)
- 27) 山内理司, 河合伸治, 大嶋 隆, 天野敦雄
Odd-skipped related 1 遺伝子の発現調節機構
 第 24 回日本骨代謝学会学術集会, 平成 18 年(2006 年)7 月 7 日 (東京都)
- 28) Kawai S, Yamauchi M, Amano A.
 Abnormal periosteal bone formation in transgenic mice expressing dominant-negative odd-skipped related 2. 28th Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research, 2006/9/17 (Philadelphila, USA)
- 29) 加藤隆大, 村上旬平, 稲葉裕明, 河合伸治, 天野敦雄
 ダウン症候群歯肉線維芽細胞への *P. gingivalis* 感染の影響
 第 48 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 18 年(2006 年)9 月 22 日 (横浜市)

- 30) 飯田 務, 江草 宏, 佐伯万騎男, 土居正典, 岡橋暢夫, 天野敦雄, 矢谷博文, 上崎善規
RANKL による破骨細胞分化における脱リン酸化酵素 calcineurin の関与
第 48 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 18 年(2006 年) 9 月 22 日(横浜市)
- 31) 稲葉裕明, 仲野和彦, 大嶋 隆, 天野敦雄
心臓血管疾患病変部組織からの口腔細菌種の検出
第 48 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 18 年(2006 年) 9 月 22 日(横浜市)
- 32) Kou Y, 稲葉裕明, 加藤隆大, 田頭素行, 本間大樹, 神田智正, 大竹康之, 天野敦雄
Hop polyphenol prevents inflammatory responses of epithelial cells stimulated with *P. gingivalis*
第 55 回日本口腔衛生学会総会, 平成 18 年 10 月 7 日(豊中市、大阪)
- 33) 加藤隆大, 稲葉裕明, 秋山茂久, 森崎市治郎, 天野敦雄
線毛遺伝子型の形質転換による *Porphyromonas gingivalis* 病原性の変化
第 23 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 18 年(2006 年) 10 月 21 日(仙台市)
- 34) 村上順平, 加藤隆大, 竹内洋輝, 秋山茂久, 天野敦雄, 森崎市治郎
ダウン症候群歯肉線維芽細胞の歯周病菌感染によるシグナル伝達の変化
第 23 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 18 年(2006 年) 10 月 21 日(仙台市)
- 35) 大野貴志, 村上順平, 秋山茂久, 森崎市治郎, 天野敦雄
P. gingivalis 感染により活性化される細胞内シグナル伝達経路
第 23 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 18 年(2006 年) 10 月 21 日(仙台市)
- 36) 河合伸治, 山内理司, 稲葉裕明, 天野敦雄
骨形成における *Odd-skipped related 2* の役割
大阪大学歯学会 第 103 回例会及び第 53 回総会, 平成 18 年(2006 年) 11 月 9 日(吹田市)
- 37) Kuboniwa M, Hasegawa Y, Mao S, Amano A, Shizukuishi S, Lamont R.
Porphyromonas gingivalis accelerates cell cycle progression in gingival epithelial cells
85th General session of the IADR, 2007/3/ 23(New Orleans, USA)
- 38) 河合伸治, 山内理司, 天野敦雄
骨形成における *Odd-skipped related 2* の細胞増殖における機能解析
第 25 回日本骨代謝学会学術集会, 平成 19 年(2007 年)7 月 20 日(大阪市)
- 39) Kou Y, Amano A.
Hop-polyphenol prevents cellular inflammatory responses
The 8th Annual Scientific Meeting of IADR Chinese Division, 2007/9/14 (Xi'an, China)
- 40) Yamauchi M, Kawai S, Amano A, Ooshima T.
Osrl gene expression is regulated by Runx2 and Ikaros transcription factors
29th Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research, 2007/9/17 (Honolulu, USA)
- 41) Kawai S, Yamauchi M, Amano A.
Odd-skipped related 2 functions in cell proliferation
29th Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research, 2007/9/17 (Honolulu, USA)
- 42) 天野敦雄, 稲葉裕明, 加藤隆大, 竹内洋輝, 秋山茂久, 森崎市治郎
ビールホップポリフェノールによる歯周炎症の抑制
第 24 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 19 年(2007 年) 11 月 24 日(長崎市)
- 43) 加藤隆大, 稲葉裕明, 竹内洋輝, 森崎市治郎, 天野敦雄,
歯肉肥大発症因子の DNA マイクロアレイ解析
第 24 回日本障害者歯科学会学術大会, 平成 19 年(2007 年) 11 月 24 日(長崎市)

(4) 特許出願

① 国内出願 (2 件)

発明者: 田頭素行、神田智正、稲葉裕明、天野敦雄
発明の名称: 歯根膜保護材
出願番号: 2004-091098 号、出願日: 2004.3.26

発明者：稲葉裕明、本間大樹、田頭素行、神田智正、天野敦雄
発明の名称：ホップ製剤の製造方法、ホップ製剤、抗炎症剤、飲食品および
口腔用品
出願番号：2006-236774、出願日：2006.8.31

②海外出願(3件)

発明者：稲葉裕明、田頭素行、神田智正、天野敦雄
発明の名称：歯根膜保護材
出願番号：特願 2004-091098 号(国際特許：米国および米国を除く全ての指
定国)
出願日：2005. 2. 52

発明者：稲葉裕明、田頭素行、神田智正、天野敦雄
発明の名称：歯根膜保護材
出願番号：第 094105807 号(台湾)
出願日：2005. 8. 5

発明者：稲葉裕明、天野敦雄、田頭素行、神田智正
発明の名称：歯根膜保護剤
出願番号：PCT/JP2005/003166(韓国)
出願日：2005.8.10

(5)受賞等

①受賞

- 1) 加藤隆大(天野研・ポスドク)
微生物学部門・最優秀ポスター発表賞
第47回歯科基礎医学会学術大会, 2005年9月29日
- 2) 河合伸治(天野研・助教)
日本骨代謝学会学術総会優秀演題賞
第24回日本骨代謝学会学術集会, 2006年7月7日

②新聞報道

- 1)細胞内の細菌殺す新たな免疫機構 国立遺伝学研など確認
読売新聞(2004. 11. 5)
- 2)細胞内の自食作用 病原性細菌も分解 国立遺伝学研と阪大が解明
感染症予防に貢献
日刊工業新聞(2004. 11. 5)
- 3)細胞自身が病原体退治 遺伝研など発見 感染症治療への応用期待
朝日新聞(2004. 11. 7)
- 4)病原菌分解する細胞内システム 吉森・遺伝研教授ら発見
科学新聞(2004. 11. 12)
- 5)めざせ不老長寿「オートファジー」に注目 病気治療 大きな期待
細菌も退治
毎日新聞(2004. 11. 13)
- 6) Autophagy Shows its Teeth in Self-Defense
CELL BIOLOGY 2004 (Press Book for 44th Annual Meeting of the
American Society for Cell Biology) (2004. 12. 3)
- 7)細胞の生き残り戦略「オートファジー」に迫る
JST News vol.1 N0.4 12-13 (2004)
- 8)「京大ウイルス研究所創立50周年記念シンポ 定説覆す報告相次ぐ 侵入細菌
を除去する自食」
読売新聞(2006.6.19)(関西)

③その他

該当無し

(6)その他特記事項

該当無し

7. 研究期間中の主な活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2002	第55回日本細胞生物学会大会細胞生物シンポジウム	横浜	数百名	ポストゴルジ・ネットワークーその個体・高次機能における役割
2002	第75回日本生化学会大会シンポジウム	京都	数百名	リソソーム・ネットワーク
2003	第76回日本生化学会大会シンポジウム	横浜	数百名	エンドソーム／リソソームへの道 ～The Long and Winding Roads～
2005 3.17 -18	オートファジーの分子機構と機能・ワークショップ	静岡	14人	本チームの主要な課題であるオートファジーについての世界的権威である基礎生物学研究所・大隅良典教授の研究室並びにオートファジーをテーマとしている他の国内研究室から研究者を招き、主に未発表の最新データを互いに発表しあい実戦的な情報交換を図った。
2006 3.13-14	オートファジー研究会	滋賀	約50名	オートファジー分野のトップ3研究室合同で行った非公開ワークショップ
2006. 6.2	千里ライフサイエンスセミナー(「オートファジーによる細胞内自己消化:分子機構から生理機能へ」)	大阪	約120名	千里ライフサイエンス振興財団主催

8. 結び

本研究の成果は目標を大きく上回るものである。研究開始後に想定外の疾患との関わりを見だし、その後、疾患を重点的に研究したことも功を奏した。一方で、分子機構の解析は予定通り確実に進めることができ、そちらでも目標以上の達成度であったと考える。機能と機構の解析を平行して進めるという当初計画を実践できた。また、途中から細菌学の専門家である大阪大学・天野敦雄教授に参加いただき、分野融合のモデルケースとなる仕事がおこなえた。本研究は、メンブレントラフィックという細胞機能の理解を促進し基礎科学の発展に寄与しただけではなく、社会的に重要性の高い疾患の予防・治療にもつながりうる知的資産を創出した点でも貢献したと考えている。オートファジーによる生体防御という本研究から生まれた新しい概念は、基礎と臨床の両面で今後さらに広がりを見せていくものと思われる。研究代表者も、本研究の成果を礎として今後研究を展開していくことになる。

研究代表者が独立する機会を得て研究室を構えた年(平成14年)に、本研究を採択していただいた。必要な機器、設備、試薬を全て揃えることができ、資金繰りに頭を悩ますこともなく研究に専念できた。それが初めて研究室を立ち上げた者にとって物心両面でどれだけ助けとなったか、言葉では言い尽くせないものがある。また研究チーム運営や研究費の運用について多くを学んだ。平成18年の研究室移転に際しても、多大なサポートを頂いた。研究の進展に伴い必要性が増したため購入して頂いた電子顕微鏡は大きな威力を発揮した。研究室の立ち上げから軌道に乗せるまでの大事な時期の本研究助成はまさに値千金であったと言える。海のものとも山のものともつかない研究を選んでくださった領域代表の大島泰郎先生並びにアドバイザーの先生方、研究のスムーズな進行に尽力いただいた領域事務所の皆さんに心から感謝申し上げる。



本研究で購入した透過型電子顕微鏡。操作しているのは、CREST技術員の大森弘子。



本研究で購入したレーザー共焦点分光顕微鏡。



研究室風景。



研究室メンバーで花見。