

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04745

研究課題名(和文) IFN 誘導性GTPaseによる細胞自律的免疫機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of IFN-inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity

研究代表者

山本 雅裕 (Yamamoto, Masahiro)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00444521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、1)正常細胞内では、インターフェロン誘導性の抗病原体因子GBPが細胞内に均質に配置すること 2)ゲノム編集で作製したGate-16欠損細胞ではGBPが細胞内で凝集し、トキソプラズマやサルモネラの病原体含有小胞上への蓄積率が低下し、病原体の効率的な排除が出来ないこと 3)ゲノム編集で作製したGate-16欠損マウスはトキソプラズマ感染に劇的に弱くなることを示しました。  
本研究成果は、近年我が国においても症例報告が急増しているトキソプラズマ症やサルモネラを原因とする重篤な食中毒に対して、Gate-16という新たな分子を標的とした新規治療戦略を提供できるものとして期待できません。

研究成果の概要(英文)：Mammalian Atg8 homologs consist of LC3 proteins and GABARAPs, all of which are known to be involved in canonical autophagy. In contrast, the roles of Atg8 homologs in noncanonical autophagic processes are not fully understood. Here we show a unique role of GABARAPs, in particular Gate-16, in IFN- $\gamma$ -mediated antimicrobial responses. Cells that lacked GABARAPs but not LC3 proteins and mice that lacked Gate-16 alone were defective in the IFN- $\gamma$ -induced clearance of vacuolar pathogens such as *Toxoplasma*. Gate-16 but not LC3b specifically associated with the small GTPase Arf1 to mediate uniform distribution of interferon-inducible GTPases. The lack of GABARAPs reduced Arf1 activation, which led to formation of interferon-inducible GTPase-containing aggregates and hampered recruitment of interferon-inducible GTPases to vacuolar pathogens. Thus, GABARAPs are uniquely required for antimicrobial host defense through cytosolic distribution of interferon-inducible GTPases.

研究分野：寄生虫免疫学

キーワード：インターフェロン トキソプラズマ 病原体

## 1. 研究開始当初の背景

寄生虫「トキソプラズマ」は原虫(単細胞の寄生虫)の一つであり、世界人口の約3割に感染しているとされている。免疫機能が正常な健常人ではトキソプラズマに感染してもほとんど症状はないが、エイズや抗癌剤投与下のガン患者あるいは免疫抑制剤を投与されている免疫不全者において致死性の脳症や肺炎を引き起こす。また妊婦が初感染した際に胎盤を通じて胎児に感染し、流産や死産あるいは感染したまま新生児が生まれ水頭症や網脈絡膜炎などを主症状とする先天性トキソプラズマ症を発病している例が近年マスコミなどでも取り上げられている。また「サルモネラ菌」は食中毒を起こす代表的な細菌であり、平成28年には我が国で31件のサルモネラ菌が関係する食中毒が起き、704人の患者が出ている。以上のように、日本においても「トキソプラズマ」や「サルモネラ菌」は依然として病気を引き起こす病原体である。

トキソプラズマやサルモネラ菌は我々宿主の体内に入りマクロファージなどの免疫細胞の中に「病原体含有小胞」で総称される膜状の特殊な構造体を作って感染して増殖する。トキソプラズマの細胞内感染に対して宿主の体では免疫反応が起きる。最も重要な因子はインターフェロンガンマと呼ばれるサイトカインであり、インターフェロンが誘導する様々なタンパク質群が病原体含有小胞(の膜)に蓄積した上でその膜を破壊してトキソプラズマやサルモネラ菌を細胞内で殺傷する。しかし、インターフェロン誘導性タンパク質がどのようにして効率よくトキソプラズマやサルモネラ菌の「病原体含有小胞」に蓄積しているのかについては良く分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

病原体含有小胞に蓄積するインターフェ

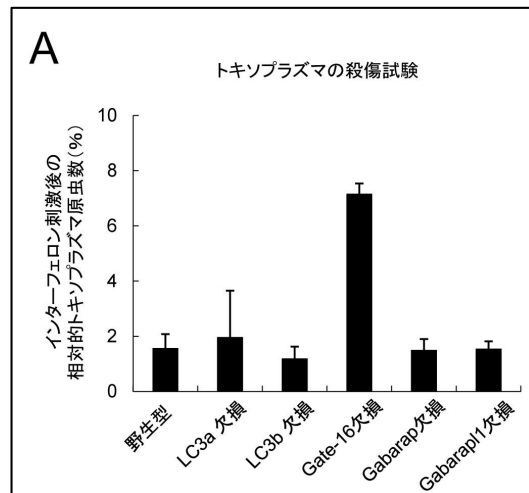
ロン誘導性GTPaseの寄生胞への蓄積の分子メカニズムを明らかにすることをもくてきとした。

## 3. 研究の方法

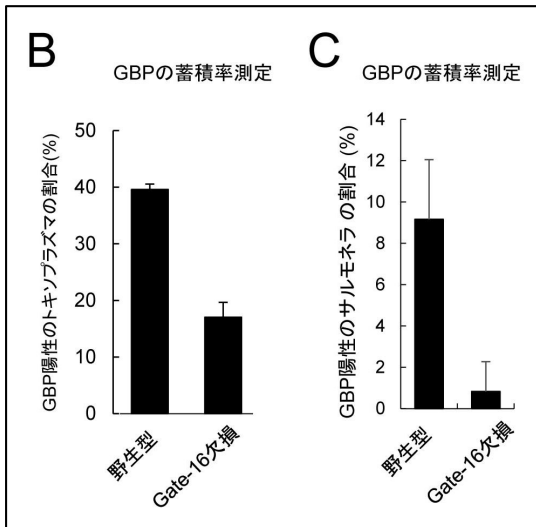
我々は、LC3a, LC3b, Gabarap, Gabarap11, Gate-16という5つのメンバーからなるATG8ファミリー分子群に着目し、それぞれの遺伝子欠損細胞をゲノム編集法で作製した。ゲノム編集法で作製した遺伝子欠損細胞は従来の胚性幹(ES)細胞を用いたノックアウト技術よりも、大幅に期間が短縮された。

## 4. 研究成果

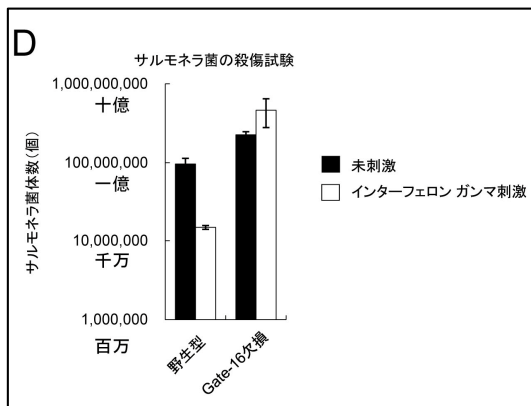
私達の研究グループは、LC3a, LC3b, Gabarap, Gabarap11, Gate-16の中でGate-16を欠損した細胞では、インターフェロンガンマ刺激によるトキソプラズマの原虫数の低下ににくいことが分かった(下図A)。



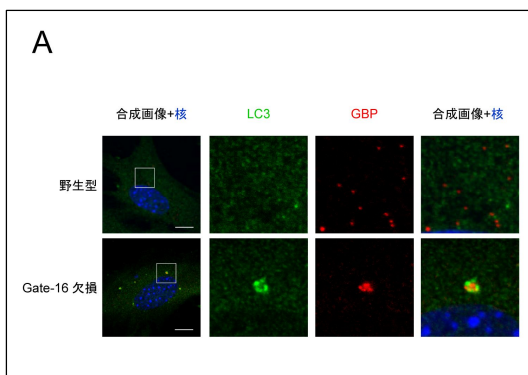
次にインターフェロン誘導性タンパク質のトキソプラズマの病原体含有小胞への蓄積について検討したところ、インターフェロン誘導性タンパク質であるGBP(トキソプラズマ破壊のための最も重要な宿主免疫分子;2012年7月発表)の蓄積がGate-16欠損細胞では野生型細胞に比べて有意に低下していた(次ページ上図B)。またサルモネラ菌の病原体含有小胞へのGBPの蓄積もGate-16欠損細胞では低下した(次ページ上図C)。



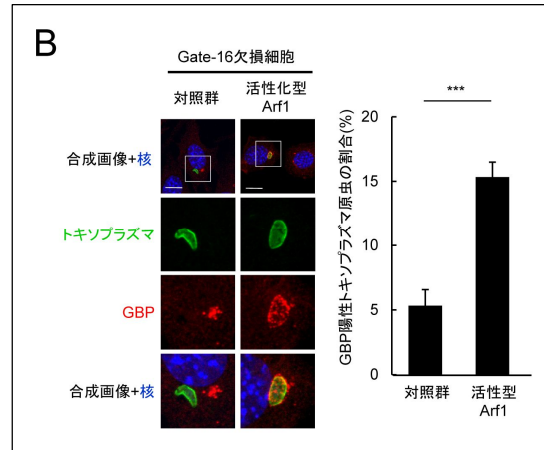
さらにインターフェロン ガンマ刺激による菌数の低下が Gate-16 欠損細胞ではほとんどみられなかった (下図 D)。



GBP は通常、インターフェロン刺激した未感染細胞では粒状で細胞質に均一に「遍在」している。一方、Gate-16 欠損細胞では、細胞質内の数箇所に凝集し「偏在」していた(下図 A)。



逆に Gate-16 欠損細胞であっても、GBP 凝集体を共生的に壊し、均一に「遍在」させると GBP がトキソプラズマの病原体含有小胞に蓄積できた (下図 B)。



これらのことから、**GBP が Gate-16 依存的に細胞質内に均一に「遍在」することが、抗病原体応答に重要である**ことがわかった。

以上の結果から、Gate-16 は抗トキソプラズマ・サルモネラ菌宿主免疫分子 GBP を細胞質内であらかじめバラバラに (バランスよく) 配置することによって、それらの病原体がどこから侵入してきても GBP と出会えるように用意し、抗病原体応答の効率的に引き起こしていると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

1) Sasai M, Pradipta A, Yamamoto M (**Corresponding author**). Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int Immunol*. 2018 Mar 10;30(3):113-119. doi: 10.1093/intimm/dxy004.

2) Santos JC, Dick MS, Lagrange B, Degrandi D, Pfeffer K, Yamamoto M, Meunier E, Pelczar P, Henry T, Broz P. LPS targets host

guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *EMBO J.* (2018) Mar 15;37(6). pii: e98089.

3) Finethy R, Luoma S, Orench-Rivera N, Feeley EM, Haldar AK, **Yamamoto M**, Kanneganti TD, Kuehn MJ, Coers J. Inflammasome Activation by Bacterial Outer Membrane Vesicles Requires Guanylate Binding Proteins. *MBio.* 2017 Oct 3;8(5). pii: e01188-17.

4) Wallet P, Benaoudia S, Mosnier A, Lagrange B, Martin A, Lindgren H, Golovliov I, Michal F, Basso P, Djebali S, Provost A, Allatif O, Meunier E, Broz P, **Yamamoto M**, Py BF, Faudry E, Sjöstedt A, Henry T. IFN- $\gamma$  extends the immune functions of Guanylate Binding Proteins to inflammasome-independent antibacterial activities during *Francisella novicida* infection. *PLoS Pathog.* 2017 Oct 2;13(10):e1006630.

5) Chida T, Ito M, Nakashima K, Kanegae Y, Aoshima T, Takabayashi S, Kawata K, Nakagawa Y, **Yamamoto M**, Shimano H, Matsuura T, Kobayashi Y, Suda T, Suzuki T. Critical role of CREBH-mediated induction of TGF- $\beta$ 2 by HCV infection in fibrogenic responses in hepatic stellate cells. *Hepatology.* (2017) Nov;66(5):1430-1443.

6) Zwack EE, Feeley E, Burton AR, Hu B, **Yamamoto M**, Kanneganti TD, Bliska JB, Coers J, Brodsky IE. Guanylate Binding Proteins regulate inflammasome activation in response to hyper-injected *Yersinia* translocon components. *Infect Immun.* (2017) 85(10). pii: e00778-16.

7) Biering SB, Choi J, Halstrom RA, Brown HM, Beatty WL, Lee S, McCune BT, Dominici E, Williams LE, Orchard RC, Wilen CB,

**Yamamoto M**, Coers J, Taylor GA, Hwang S. Viral Replication Complexes Are Targeted by LC3-Guided Interferon-Inducible GTPases. *Cell Host Microbe.* (2017) 22:74-85.e7.

8) Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley DM, Yoshimori T, **Yamamoto M (Corresponding author)**.

Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat Immunol.* (2017) 18:899-910.

9) Man SM, Karki R, Sasai M, Place DE, Kesavardhana S, Temirov J, Frase S, Zhu Q, Malireddi RK, Kuriakose T, Peters JL, Neale G, Brown SA, **Yamamoto M**, Kanneganti TD. IRGB10 Liberates Bacterial Ligands for Sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes. *Cell.* (2016) 167:382-396.

10) Ozaki T, Muramatsu R, Sasai M, **Yamamoto M**, Kubota Y, Fujinaka T, Yoshimine T, Yamashita T. The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning. *Sci Rep.* (2016) 6:25893.

11) Aizawa S, Okamoto T, Sugiyama Y, Kouwaki T, Ito A, Suzuki T, Ono C, Fukuhara T, **Yamamoto M**, Okochi M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Suzuki R, Shoji I, Moriishi K, Moriya K, Koike K, Matsuura Y. TRC8-dependent degradation of hepatitis C virus immature core protein regulates viral propagation and pathogenesis. *Nat Commun.* (2016) 7:11379.

12) Okumura R, Kurakawa T, Nakano T, Kayama H, Kinoshita M, Motooka D, Gotoh K, Kimura T, Kamiyama N, Kusu T, Ueda Y, Wu H, Iijima H, Barman S, Osawa H, Matsuno H,

Nishimura J, Ohba Y, Nakamura S, Iida T, **Yamamoto M**, Umemoto E, Sano K, Takeda K. Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature*. (2016) 532:117-21.

13) Finethy R, Jorgensen I, Haldar AK, de Zoete MR, Strowig T, Flavell RA, **Yamamoto M**, Nagarajan UM, Miao EA, Coers J. Guanylate binding proteins enable rapid activation of canonical and noncanonical inflammasomes in Chlamydia-infected macrophages. *Infect Immun*. (2015) 83:4740-9.

14) Hammoudi PM, Jacot D, Mueller C, Di Cristina M, Dogga SK, Marq JB, Romano J, Tosetti N, Dubrot J, Emre Y, Lunghi M, Coppens I, **Yamamoto M**, Sojka D, Pino P, Soldati-Favre D. Fundamental Roles of the Golgi-Associated **Toxoplasma** Aspartyl Protease, ASP5, at the Host-Parasite Interface. *PLoS Pathog*. (2015) 11:e1005211.

15) Lee Y, **Sasai M**, Ma J, Sakaguchi N, Ohshima J, Bando H, Saitoh T, Akira S, **Yamamoto M (Corresponding author)**. p62 plays a specific role in interferon- $\gamma$ -induced presentation of a *Toxoplasma* vacuolar antigen. *Cell Rep*. (2015) 13:223-233.

16) Ohshima J, **Sasai M**, Liu J, Yamashita K, Ma JS, Lee Y, Bando H, Howard JC, Ebisu S, Hayashi M, Takeda K, Standley DM, Frickel EM, **Yamamoto M (Corresponding author)**. RabGDI $\alpha$  is a negative regulator of interferon- $\gamma$ -inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2015) 112:E4581-4590.

17) Ito D, Nojima S, Nishide M, Okuno T, Takamatsu H, Kang S, Kimura T, Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y, Hosokawa T, Toyofuku T, Ohshima J, Kamimura D, **Yamamoto M**, Murakami M, Morii E, Rakugi H, Isaka Y, Kumanogoh A. mTOR Complex Signaling through the SEMA4A-Plexin B2 Axis Is Required for Optimal Activation and Differentiation of CD8<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol*. (2015) 195:934-43. doi:10.4049/jimmunol.1403038.

18) Meunier E, Wallet P, Dreier RF, Costanzo S, Anton L, Rühl S, Dussurgey S, Dick MS, Kistner A, Rigard M, Degrandi D, Pfeffer K, **Yamamoto M**, Henry T, Broz P. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nat Immunol*. (2015) 16:476-484.

19) Man SM, Karki R, Malireddi RK, Neale G, Vogel P, **Yamamoto M**, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The transcription factor IRF1 and guanylate-binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by *Francisella* infection. *Nat Immunol*. (2015) 16:467-475.

〔学会発表〕(計9件)

1. 山本雅裕 「抗トキソプラズマ宿主免疫が明らかにした ATG 分子群のオートファジー非依存的役割」2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (神戸、兵庫県、2017 年 12 月 6 日)
2. Masahiro Yamamoto 「Immunoparasitology of *Toxoplasma gondii*」 Keynote lecture-5 ICE on IMERI The 2<sup>nd</sup> International Conference and Exhibition on Indonesian Medical Education and Research Institute (Jakarta, Indonesia, November 7<sup>th</sup>-9<sup>th</sup>, 2017)
3. Masahiro Yamamoto 「A mechanism of interferon- $\gamma$ -induced anti-*Toxoplasma gondii* host defense」The 7<sup>th</sup> International Symposium on Parasitology (Jiujiang City, Jiangxi Province, China, 13-17 October,

2017)

4. 山本雅裕、笹井美和、坂口直哉、馬知秀  
「Atg8 ファミリーのインターフェロン誘導性自然免疫における役割について」  
The 3<sup>rd</sup> Annual meeting of Japanese Society of Osteoimmunology 2017 ISHIGAKI (ANA インターコンチネンタル石垣リゾート、石垣、沖縄, 2017年6月27日—6月29日)
5. **Masahiro Yamamoto** 「GABARAPs are required for LC3s-independent anti-Toxoplasma gondii host defense through cytosolic distribution of interferon-inducible GTPases」(Toxo14, The 14<sup>th</sup> biennial conference of the *Toxoplasma gondii* research community, Tomar, Portugal, May 31th-June 4<sup>th</sup>)
6. **Masahiro Yamamoto** 「Critical role of GABARAP Atg8 subfamily in IFN- $\gamma$ -induced cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii*」WHIP 2017 21<sup>th</sup> Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA, April 2-5, 2017)
7. Miwa Sasai, Ji Su Ma, Youngae Lee, Hironori Bando, **Masahiro Yamamoto**  
「Essential role of Gate-16 in anti-*Toxoplasma gondii* immune response」  
第10回 寄生虫感染免疫研究会(徳島大学、徳島、2017年2月9・10日)
8. **Masahiro Yamamoto** 「Interferon-induced activation of cell-autonomous immunity against vacuolar pathogens」S11. Vaccine and Infectious Disease, The 45<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Society for Immunology (Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan, December 5-7, 2016)
9. **Masahiro Yamamoto** 「Mechanism of IFN- $\gamma$ -inducible cell-autonomous immunity to intracellular pathogens」The 15<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity (Awaji Yumebutai International Conference Center on Awaji Island, Hyogo, Japan, September 6<sup>th</sup>-9<sup>th</sup>, 2016)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 雅裕 (YAMAMOTO, Masahiro)  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号：00444521

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

笹井 美和 (SASAI, Miwa)