

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00974

研究課題名(和文)細胞内輸送が厳密に制御する自然免疫分子STINGの活性・不活性化の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism underlying STING activation/inactivation with membrane traffic

研究代表者

田口 友彦 (TAGUCHI, TOMOHIKO)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10300881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、自然免疫分子STINGの活性化と不活性化の両者が、細胞内物質輸送(小胞体・ゴルジ体・リサイクリングエンドソーム・リソソーム)により厳密に制御されていることが明らかになった。具体的には、定常状態での小胞体局在を担保するために「ゴルジ体・小胞体」逆行性輸送経路が必要であること、その破綻が自己炎症性疾患COPA異常症を引き起こしていること、リソソームへの移行・分解がマイクロオートファジーにより行われていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リソソームが、細胞質(膜)成分を直接飲み込み分解する能力(マイクロオートファジー)を有していることを示した本研究成果は、リソソームの新しい機能を明らかにしたという学術的価値をもつ。今後は、隔離膜を利用するマクロオートファジーとどのように使い分けがなされているのか追究していくことで、細胞内分子のホメオスタシス制御について新しい概念が生まれることが期待される。

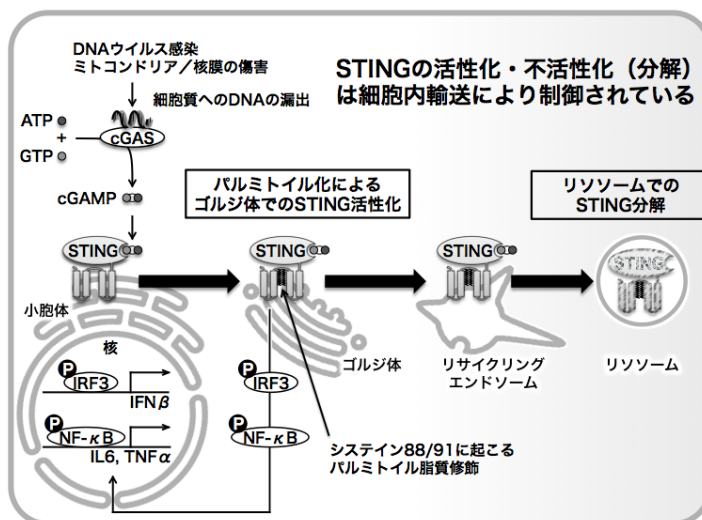
研究成果の概要(英文)：This study showed that activation and inactivation of STING was strictly regulated by membrane traffic, i.e., ER-the Golgi-recycling endosomes-lysosome. The retrograde transport from the Golgi to the ER was found to be essential for the steady state localization of STING at the ER. The impaired retrograde traffic resulted in the spontaneous activation of STING at the Golgi, which underlies the pathogenesis of the COPA syndrome. The delivery and degradation of STING at lysosomes was found to be mediated by microautophagy, in which lysosomes directly encapsulate STING into lysosomal lumen.

研究分野：細胞生物学

キーワード：membrane traffic innate immunity microautophagy Golgi lysosome

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、異物を排除するための先天的に備わっているプログラムである。近年、ウイルスの感染や核・ミトコンドリア膜の傷害によって細胞質に漏出した DNA が異物として認識され、自然免疫応答を誘導することが明らかになった。この応答の要が小胞体膜タンパク質 STING である。申請者は STING の活性化に、STING の細胞内輸送が必須であることを見出し、その活性化の実体がゴルジ体で起きる STING のパルミトイル化脂質修飾であることを発見した (Mukai et al., *Nat Commun* 2016)。STING は、さらにリサイクリングエンドソームを経由してリソソームへ移動して分解を受け、STING のシグナルは収束する。即ち、小胞体から始まる一連の STING の細胞内局在変化が STING の活性化を厳密に制御していること、を明らかにしてきた。しかしながら、STING の「小胞体→ゴルジ体→リサイクリングエンドソーム→リソソーム」輸送を制御する分子基盤については不明な点が多く残されている。



2. 研究の目的

本研究では、STING の細胞内輸送を制御する分子機構を明らかにすることを目的とする。特に、細胞質 DNA 刺激が無い状況での「STING の小胞体局在を担保する分子機構」、「リサイクリングエンドソームからリソソームへの輸送を制御する分子機構」の二つに焦点をあてて解析を行う。

3. 研究の方法

高解像度ライブイメージング、ノックダウンスクリーニング、STING 結合タンパク質の同定、などの細胞生物学・生化学的な様々な解析を用いて、STING の細胞内輸送を制御する分子機構を明らかにする。自己炎症性疾患 COPA 異常症 (Watkin et al., *Nat Genet* 2015) の症状が、STING の点変異により発症する自己炎症性疾患 SAVI の症状と極めて似ていることから、COPA 異常症の原因となる COP-I 小胞の α -subunit (以下 COPA) による STING の制御に注目して解析を行う。

4. 研究成果

(1) COPA 異常症における STING の自発的な活性化

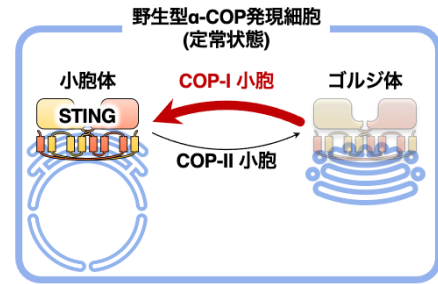
(Den et al., *J Exp Med* 2020, Mukai et al, *Nat Commun* 2021 にて公表)

COPA 異常症モデルマウス及び患者由来細胞を用いてその病態発症の分子メカニズムを解析したところ、COPA 異常症ではウイルス感染が起きていない状態でも STING がゴルジ体に蓄積してしまい、恒常的に炎症応答が惹起されていることを見出した。さらに、COPA 異常症患者由来細胞を STING 特異的パルミトイル化阻害剤で処理したところ、STING の活性化によって誘導される I 型インターフェロンの発現が抑制された。これらの結果は、野生型の STING と同様に COPA 異常症に於ける STING の活性化についても、ゴルジ体で起きる STING のパルミトイル脂質修飾が必要であることを示唆している。

病気型 COPA の発現によって STING の細胞内局在が変化する分子メカニズムについては、STING 結合タンパク質の解析から迫った。無刺激時に STING に結合するタンパク質の中から COPA に結合するアミノ酸配列 (KKXX および KXXXX) を有するもの 18 タンパク質を選抜し、個々に siRNA ノックダウン実験を行った。その結果、Surf4 のノックダウンにより、STING の小胞体局在が失われることが明らかになった。SURF4 は STING と COPA の両者に結合することができるが、病気型 COPA との結合は損なわれていた。これらの知見から、次ページに示すモデルを提唱した (Mukai et al, *Nat Commun* 2021)。

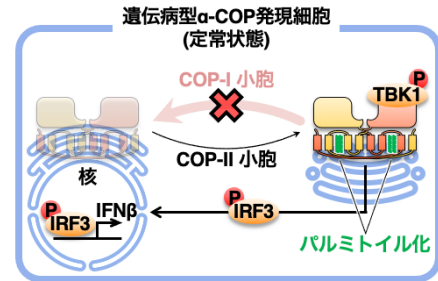
無刺激時：

小胞体から漏出した STING は、ゴルジ体において COPA-SURF4-STING のインタラクションにより COP-I 小胞輸送系を使って小胞体へ連れ戻される。この作用の結果、STING の小胞体局在が保持されている。STING の活性化の場である trans-Golgi network に STING が輸送されることがないので、STING は不活性化状態に保たれる。



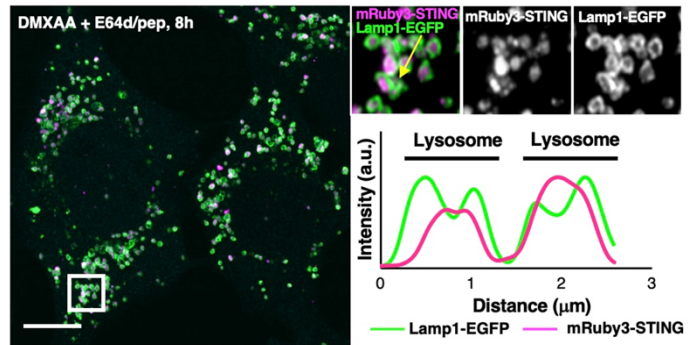
病気型 COPA 発現細胞：

小胞体から漏出してゴルジ体に到達した STING は、COPA と SURF4 のインタラクションが阻害されているので、COP-I 小胞に搭載されない。よって、STING を小胞体へ連れ戻すことができない。STING はゴルジ体の中を分泌経路ののってさらに移動し、trans-Golgi network に到達し、パルミトイル脂質修飾を受けて活性化する。

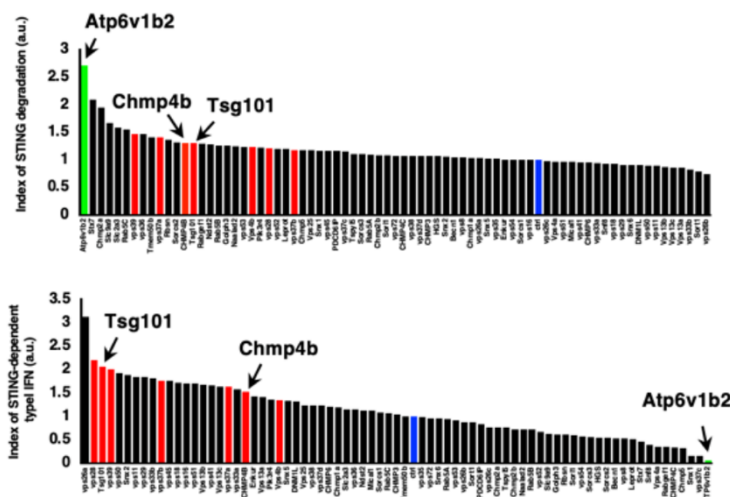


(2) 「リサイクリングエンドソーム→リソソーム」 輸送の制御分子機構

リソソームプロテアーゼ阻害剤 (E64d/pepstatin) の存在下で、DMXAA (膜透過性 STING アゴニスト) で刺激した STING とリソソーム (Lamp1 タンパク質) をイメージングしたところ、STING はリソソームの限界膜ではなく、リソソームの内腔に蓄積することが観察された。リソソームの内腔へのアクセスについては、マクロオートファジー、膜融合、マイクロオートファジー (リソソームによる直接的な内包化) の 3 つの経路が考えられる。Atg 遺伝子のノックアウト細胞でも STING の分解が正常に起きること、STING がリソソーム局在を示した時点では酸性環境に晒されていないことなどから、マイクロオートファジー経路が STING 分解に関与していることが示唆された。



「リサイクリングエンドソーム→リソソーム」経路は哺乳細胞では新規物質輸送経路であり、その制御因子は不明である。一方、酵母においては、「ゴルジ体→リソソーム」という物質輸送経路が知られており、この経路を制御している約 70 種類の vps 遺伝子 (vacuolar protein sorting) が同定されている。そこで、酵母 vps 遺伝子の哺乳類ホモログ約 80 種類について発現抑制スクリーニングを行い、STING の分解および I 型インターフェロン応答の 2 点から評価を行った。その結果、「STING 分解の抑制」かつ「I 型インターフェロン応答が持続」する遺伝子を複数同定した (Vps28, Tsg101, Vps39, Vps37b, Vps37a, Champ4b, Vps4b)。



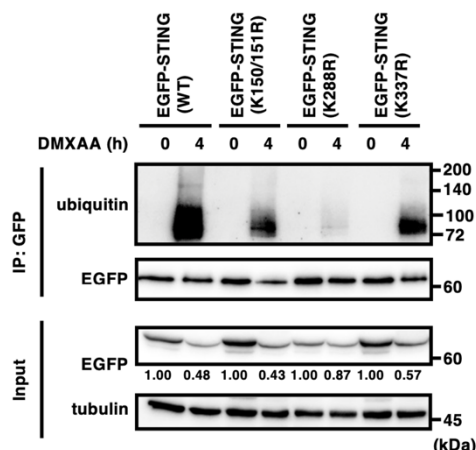
両基準を満たした遺伝子

mammal	yeast	function
Vps28	vps28	ESCRTI
Tsg101	vps23	ESCRTI
Vps39	vps39	HOPS
Vps37b	vps37	ESCRTI
Vps37a	vps37	ESCRTI
Champ4b	vps32	ESCRTIII
Vps4b	vps4	ESCRTIII

興味深いことに、Vps39 を除く 6 つの遺伝子は、膜の変形に関与する ESCRT 複合体のサブユニットであった。よって、リソソームマイクロオートファジーによる STING の分解には、ESCRT 複合体が関与することが示唆された。

TSG101 はユビキチンを認識するドメインを N 末端にもつ。そこで刺激後に STING がユビキチン修飾を受ける可能性を考えて検討を行ったところ、刺激後 4 時間後（STING がリサイクリングエンドソームに到達する時間）において、STING が高度にユビキチン化を受けることが明らかになった。さらに、288 番目のリジン残基をアルギニン残基に変異させた STING (K288R) ではユビキチンのシグナルが激減したことから、K288 にユビキチン修飾が起きることが示唆された。また、STING (K288R) は分解に対して抵抗性を示した。

次に、Tsg101 のノックダウン下での STING の局在を観察したところ、STING はリソソームに取り込まれることなくリサイクリングエンドソームで小胞化した状態で蓄積していることが明らかになった。このリサイクリングエンドソーム局在は、siRNA 耐性の Tsg101 の発現で消失したが、ユビキチン結合領域を欠損した Tsg101 変異体の発現では持続した。



以上のことから、

- STING はリサイクリングエンドソームで K288 残基にポリユビキチン修飾を受ける
- TSG101 はこのポリユビキチン修飾を認識して STING に結合する
- TSG101/ESCRT 複合体の機能により、STING 膜（小胞）がリソソームに直接飲みこまれる

という 3 つのステップが、STING の「リサイクリングエンドソーム→リソソーム」輸送を制御していることが示唆された。

今後は、STING をリサイクリングエンドソームでユビキチン化する E3 リガーゼの同定、及びリサイクリングエンドソームから生じる STING 小胞の実体の解明を通じて、リソソームマイクロオートファジーの生物学的役割を明らかにしていきたい。STING 以外の分解基質の同定も重要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kemmoku Haruka, Kuchitsu Yoshihiko, Mukai Kojiro, Taguchi Tomohiko	4. 巻 47
2. 論文標題 Specific association of TBK1 with the trans-Golgi network following STING stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 19~30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.21080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mukai Kojiro, Ogawa Emari, Uematsu Rei, Kuchitsu Yoshihiko, Kiku Fumika, Uemura Takefumi, Waguri Satoshi, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Arai Hiroyuki, Shum Anthony K., Taguchi Tomohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Homeostatic regulation of STING by retrograde membrane traffic to the ER	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-20234-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Kanoko, Niki Takahiro, Ogawa Emari, Fumika Kiku, Nishioka Yu, Sawa Masaaki, Arai Hiroyuki, Mukai Kojiro, Taguchi Tomohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 A cell-free assay implicates a role of sphingomyelin and cholesterol in STING phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91562-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Deng Zimu, Chong Zhenlu, Law Christopher S., Mukai Kojiro, Ho Frances O., Martinu Tereza, Backes Bradley J., Eckalbar Walter L., Taguchi Tomohiko, Shum Anthony K.	4. 巻 217
2. 論文標題 A defect in COPI-mediated transport of STING causes immune dysregulation in COPA syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20201045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Taguchi, T., Mukai, K.	4. 巻 59
2. 論文標題 Innate immunity signalling and membrane trafficking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr. Opin. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceb.2019.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hansen, A. L., Mukai, K., Schopfer, F. J., Taguchi, T., and Holm, C. K.	4. 巻 16
2. 論文標題 STING palmitoylation as a therapeutic target	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Mol Immunol	6. 最初と最後の頁 236-241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-019-0205-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 向井康治朗、田口友彦	4. 巻 91
2. 論文標題 脂質修飾依存的なSTING活性化を中心とした自然免疫の分子機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 706-710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田口友彦、朽津芳彦、高阿田有希、篠島あゆみ、向井康治朗、植村武文、和栗聡
2. 発表標題 自然免疫分子STINGのマイクロオートファジー分解
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朽津芳彦、向井康治朗、高阿田有希、篠島あゆみ、植村武文、和栗聡、田口友彦
2. 発表標題 リソソーム分解を介した自然免疫応答経路STINGシグナルの収束機構
3. 学会等名 第5回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱野菜里、朽津芳彦、向井康治朗、田口友彦
2. 発表標題 ESCRT複合体の欠損はcGAS/STING経路に依存した炎症応答を引き起こす
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見目悠、向井康治朗、田口友彦
2. 発表標題 自然免疫分子STINGはtrans-Golgi networkにおいて下流キナーゼTBK1をリクルートする
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井 康治朗、小川笑満里、植松黎、朽津芳彦、菊史佳、植村武文、和栗聡、鈴木健裕、堂前直、新井洋由、Anthony K. Shum、田口友彦
2. 発表標題 自然免疫分子STINGの小胞体局在維持機構とその破綻に起因する疾患
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋花乃子、向井康治朗、田口友彦
2. 発表標題 TBK1によるSTINGのリン酸化におけるコレステロールとスフィンゴミエリンの意義
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朽津芳彦、高阿田有希、篠島あゆみ、向井康治朗、田口友彦
2. 発表標題 自然免疫分子STINGのマイクロオートファジー分解
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口友彦、向井康治朗
2. 発表標題 難病COPA異常症の発症分子機構
3. 学会等名 第4回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見目悠、向井康治朗、田口友彦
2. 発表標題 自然免疫分子STINGはtrans-Golgi networkにおいて下流キナーゼTBK1をリクルートする
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋花乃子、湯本瑛亮、高谷英子、進藤瑠璃、高阿田有希、篠島あゆみ、堀口雛、朽津芳彦、向井康治朗、田口友彦
2. 発表標題 リン酸化STINGを認識するモノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高谷英子、向井康治朗、田口友彦
2. 発表標題 cGAMP依存的なSTINGの多量体形成
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口友彦、向井康治朗
2. 発表標題 自然免疫分子STINGの活性化を支えるゴルジ体脂質ドメイン
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口友彦、向井康治朗
2. 発表標題 自然免疫分子STINGの活性を厳密に制御する細胞内物質輸送
3. 学会等名 2019年生理学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向井康治朗、仁木隆裕、新井洋由、田口友彦
2. 発表標題 自然免疫分子STINGの活性化分子機構
3. 学会等名 第92回生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko Taguchi
2. 発表標題 Indication of the involvement of a Golgi sphingomyelin-enriched domain in the innate immunity signalling
3. 学会等名 GLYC025th（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田口友彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 9
3. 書名 The Lipid	

1. 著者名 田口友彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 5
3. 書名 The Lipid	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California San Francisco			
デンマーク	Aarhus University			