

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 2 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22770194

研究課題名（和文） 異物に対するオートファジーとユビキチン化シグナル

研究課題名（英文） Ubiquitination mediated autophagy against invading bacteria

研究代表者

藤田 尚信（FUJITA NAONOBU）

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：00506496

研究成果の概要（和文）：細胞内に侵入した病原性細菌などの“異物”上にはユビキチン化されたタンパク質が局在しており、選択的なオートファジーに重要な役割を果たしている。しかしながら、どのようなタンパク質がユビキチン化されるのか不明であった。本研究では異物のまわりに局在するユビキチン化されたタンパク質の同定を試みた。その結果、トランスフェリンレセプターを含む種々の宿主由来のエンドソームタンパク質がユビキチン化を受けており、それらが選択的オートファジーに重要な役割を持つことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Although ubiquitination is thought to be important for the autophagic response to invading bacteria (also called xenophagy), it remains enigmatic whether ubiquitin is conjugated to bacterial proteins or host cellular proteins. Here we found that rupture of endosome by bacterial toxin or transfection reagent leads to ubiquitination of host cellular endosomal proteins, and that is sufficient for induction of selective autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：オートファジー、ユビキチン、タンパク質分解、

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物に備わる大規模な細胞内分解経路である。その一義的な機能は細胞構成成分の代謝回転であるが、近年、細胞内に侵入した病原性細菌やウイルスの排除にもオートファジーが関与しているこ

とが明らかにされている。細胞質内に侵入したサルモネラ、リステリア、A 群連鎖球菌などの病原性微生物がオートファゴソーム膜で包まれる場合には、非選択的過程である飢餓誘導性のオートファジーとは異なり、明らかに選択性がある。しかしその標的認識の分

子機構は明らかにされていない。オートファゴソーム膜に包まれたサルモネラやリステリアはユビキチン化されたタンパク質と高頻度に共局在することが報告されている。またこれらに加えて、A群連鎖球菌を感染させた場合や細胞内にラテックスビーズを人為的に導入した場合にも同様の現象が観察される。これらの知見から、基質選択的オートファジーにはユビキチン化が重要な役割を果たしていると考えられている。その局在から、細胞質に侵入した“異物”上に見られるユビキチン化タンパク質は、病原性微生物など“異物”由来のタンパク質であろうと考えられている。しかしながら直接的な証拠は示されておらず、“異物”の侵入に伴い、宿主細胞由来のタンパク質がユビキチン化を受け、選択的オートファジーの標的になっている可能性も残されている。

## 2. 研究の目的

基質選択的オートファジーの標的となる“異物”上に局在するユビキチン化タンパク質の同定をはじめの目的とした。また同定された基質タンパク質の情報を元に、その分子メカニズムの解明、さらにはユビキチン化を伴う選択的オートファジーの実態解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 病原性微生物であるサルモネラ菌を感染、あるいはラテックスビーズを細胞に人為的に導入して、異物選択的なオートファジーを誘導させた。細胞を破碎した後に、オートファゴソーム膜で包まれた“異物”を含むフラクションを多段階の遠心操作にて精製した。精製したオートファゴソーム膜フラクションを界面活性剤で用いて可溶化した後に、抗ユビキチン抗体を用いて選択的オートファゴソームに含まれるユビキチン化タンパク質を精製した。さらに、精製されたタンパク質をウエスタンブロッティングと質量分析により解析した。

(2) 同定されたタンパク質の細胞内局在を細胞生物学的手法により検討した。またそれらのタンパク質のユビキチンやオートファゴソームマーカーとの共局在の様子も観察した。

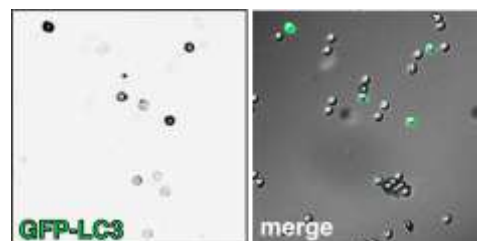
(3) 基質選択的オートファゴソームの詳細な構造を観察すべく、蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像を対応させて、選択的オートファゴソームの微細構造を観察した。

(4) さらに、“異物”の侵入に伴うユビキチン化のダイナミクスを明らかにするため、蛍光タンパク質を用いた生細胞観察も合わせて行った。

## 4. 研究成果

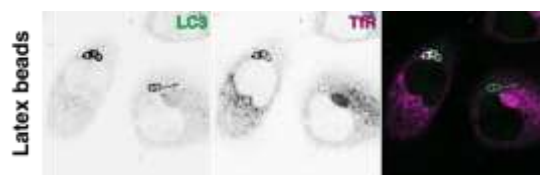
(1) ショ糖を用いた密度勾配遠心などを併用

して、ラテックスビーズに対する基質選択的オートファゴソーム膜フラクションを高純度に精製した。

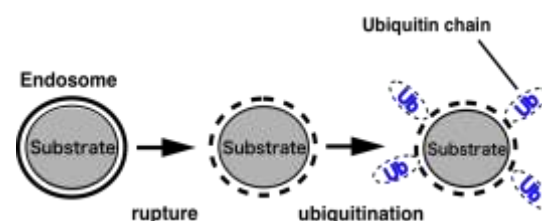


その後、界面活性剤を用いてタンパク質を可溶化し、ユビキチン化タンパク質を抗ユビキチン抗体にて精製した。それらを解析したところ、トランスフェリンレセプターをはじめとする宿主細胞由来のエンドソームタンパク質が同定された。

(2) 同定された分子の局在を免疫染色法とウエスタンブロッティングにより検討した。予想と一致してそれらのタンパク質は細胞内に導入したビーズやサルモネラ菌のまわりに局在することが確認された。またその際に、ユビキチン鎖やオートファゴソームの特異的なマーカーであるLC3と共局在する様子が観察された。



(3) さらに、電子顕微鏡と蛍光顕微鏡を併用して、基質選択的オートファゴソームを選択的に観察したところ、選択的オートファジーの基質となるラテックスビーズ、サルモネラ菌と二重膜のオートファゴソーム膜との間に一重のエンドソーム膜が観察された。この結果は、完全に細胞質に抜け出した“異物”ではなく、障害を受けたエンドソーム膜がオートファジーの標的となっていることを示唆している。先の宿主細胞のエンドソームタンパク質がユビキチン化を受けていることと合わせて考えると、エンドソーム膜の損傷に伴いエンドソーム膜タンパク質がユビキチン化を受け、選択的オートファジーの標的になっていると考えられる。



これらの結果は病原性細菌などの“異物”由来のタンパク質のユビキチン化を否定するものではないが、本課題で用いたラテックスビーズはその表面にタンパク質を全く持たないことから、“異物”由来のタンパク質のユビキチン化が無くとも、障害を受けたエンドソームタンパク質のユビキチン化のみで選択的オートファジーの誘導に十分であると考えられる。

(4) エンドソーム膜の破れに伴うユビキチン化のダイナミクスをライブイメージングにて観察した。膜の破れをモニターする分子として、mRFPを融合させたガレクチン3を用いた。複合糖質の糖鎖はオルガネラの内腔側に配向しており、細胞質側には見られない。従って、ガレクチンは通常細胞質に均一に局在するが、エンドソーム膜の損傷に伴い複合糖質の糖鎖が細胞質側へ露出され、そこへガレクチンが集積することが知られている。また、ユビキチンの可視化にはGFPを融合させたユビキチン分子を用いた。トランスフェクション試薬をコートしたラテックスビーズを細胞に導入し観察したところ、ガレクチンの集積とほぼ同時、もしくは数分後にユビキチン化が起こる事が明らかになった。これまでエンドソーム膜の損傷に伴うユビキチン化を担うE3酵素は報告されていないが、特異的な分子の関与が想像させられる。

これまでに私たちは、選択的に局在するE3酵素を複数見出している。それらの解析はまだ十分にされていないが、エンドソーム膜の損傷に伴うユビキチン化は基質選択的オートファジーを誘導する重要なステップであり、そのメカニズムの解明は今後の大きな課題であろうと思われる。

## 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9件)

[1] Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Fujita N, Yoshimori T, Isaka Y, Rakugi H. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am. J. Pathol.* (2012) 180; 517-525 査読有り

[2] 藤田尚信、吉森保 「バクテリアの侵入時にみられるユビキチン化とAtg蛋白質の局在化機構」炎症と免疫 (2012) 20 ; 38-42 査読なし

[3] Ishibashi K, Fujita N, Kanno E, Omori H, Yoshimori T, Itoh T, Fukuda M. Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex. *Autophagy* (2011) 7; 1500-1513 査読有り

[4] Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.* (2011) 86; 13185-94 査読有り

[5] Fujita N and Yoshimori T. Ubiquitination-Mediated Autophagy Against Invading Bacteria. *Curr. Opin. Cell Biol.* (2011) 4; 492-497 査読有り

[6] 藤田尚信、吉森保 「オートファジー～分子機構と疾患との関わり～」BIOCLINICA (2011) 26; 369-372 査読なし

[7] Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* (2011) doi: 10.1002/ijc.26374 査読有り

[8] Moreau K, Lacas-Gervais S, Fujita N, Sebbane F, Yoshimori T, Simonet M, Lafont F. Autophagosomes can support *Yersinia pseudotuberculosis* replication in macrophages. *Cell Microbiol.* (2010) 12; 1108-1123 査読有り

[9] Furuta N, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Amano A. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vtilb mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol. Biol. Cell* (2010) 21; 1001-1010 査読有り

[学会発表] (計4件)

[1] Naonobu Fujita, Megumi Nakaoka, Kageyama Shun, Yuuki Osada, Eiji Morita, Takeshi Noda, and Tamotsu Yoshimori [Ubiquitination-mediated selective autophagy] 日本生化学会、京都、2011. 9. 24

[2] 藤田尚信、吉森保 [感染微生物に対する  
オートファジーの分子機構] Biochemistry  
and Molecular Biology 2010 (招待講演)  
神戸、2010. 12. 9

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yoshimori/jp/achievement/010/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 尚信 (FUJITA NAONOBU)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：00506496