

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790413

研究課題名(和文) 新たな免疫システムとしてのオートファジーの膜動態解析

研究課題名(英文) Xenophagy membrane dynamics

研究代表者

野澤 孝志 (Nozawa, Takashi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10598858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト上皮細胞内に侵入したA群レンサ球菌を分解するオートファジーの制御メカニズムの解析を行い、新たに4つのタンパク質(Rab9, Rab23, Rab17, Rab30)を細菌分解時のオートファジー制御因子として同定した。こうした制御因子は、細胞が自己成分を分解する時のオートファジーでは働いておらず、細菌感染時に特有のメカニズムであることが示唆された。これらの結果は、細菌をターゲットにした対処法ではなく、より根本的な感染制御法の構築において重要な基盤情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We could identify newly 4 Rab GTPases as an autophagy regulator during bacterial infection. These Rab proteins were not involved in starvation-induced autophagy, suggesting these regulators are responsible for autophagic membrane dynamics for bacteria.

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

A群レンサ球菌はレンサ球菌種の分類学上の分類基準種であり咽頭炎やリウマチ熱、急性系球体腎炎など多彩な病態を示し、劇症型A群レンサ球菌感染症の起原菌として知られている。本菌は感染時、上皮細胞内部への侵入を果たすが、その一部は宿主のオートファジー（自食作用）により分解される(Nakagawa I, et al., 2004, **Science**, 140; 161-166)。この免疫システムとしてのオートファジーの分子メカニズムに関する研究は近年活発に行われており、細胞内に侵入した菌の認識システムを担う分子群が同定され、オートファジーの誘導シグナル経路が明らかとなってきた。申請者も以前から、A群レンサ球菌感染に対するオートファジーについて研究を行っており、細胞内の病原体センサータンパク質が菌を認識し、様々な分子と結合することでオートファジーの誘導を行っていること、また感染時特異的なオートファジー制御因子などを明らかにしてきた。しかしながら、細胞内で新生されるオートファジーの膜成分はどこから派生し、どのように病原体周囲まで輸送するのか、また巨大な菌を取り囲むに足る膜成分の供給システムはどうなっているのかといった、オートファジーの基本メカニズムが未だ解明されていない。感染に対するオートファジーの“膜動態メカニズム”の解明は、今後オートファジーを制御し臨床研究へ発展させる上で必須になることから、本研究は学術的に重要なだけでなく、社会的・経済的にも大きな意味を持つ、緊急の課題である。

膜動態制御の基盤となる細胞内輸送は、機能分子を選別し、その分子が機能する“場”にまで輸送するシステムで、輸送の形態としては小胞輸送と小胞によらない輸送に大別される。オートファジーの場合、膜動態システムであることから、小胞輸送と似た制御因子を用いている、もしくは小胞輸送を利用した機構である可能性が高いと考えられている。

小胞輸送を制御する主なタンパク質ファミリーとして、低分子量 G タンパク質 Rab GTPase が知られている。Rab タンパク質は、これまでに 60 種以上が同定されており、細胞内の特定の膜系に局在し、標的となる膜と小胞が融合する際に必要とされる。この Rab タンパク質群が細菌感染時のオートファジーの重要な因子である可能性は高く、実際、Rab タンパク質群の一つである、Rab7 はオートファジーにおいて細菌感染時特異的な機能を担っているという報告がある。すなわち、細菌が感染した細胞内における Rab タンパク質群の挙動をリアルタイムに可視化し、オートファジーに関わる Rab タンパク質を同定・機能解析することで、免疫システムとしてのオートファジーの膜動態の全容を解明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

免疫システムとしてのオートファジーの膜動態を解明することを目的とし、A群レンサ球菌を分解するオートファジーの膜輸送を制御する分子群を同定し、その挙動・機能を明らかにする。特に、細胞内膜輸送を司る主要なタンパク質群、低分子量 G タンパク質 Rab に着目し、細菌が感染した細胞内における Rab タンパク質群の挙動をリアルタイムに可視化し、オートファジーにおける機能解析を行う。

3. 研究の方法

本研究は、免疫システムのオートファジーの膜動態解析を行うため、Rab ファミリータンパク質に着目し、下記の項目 1~6 の順に遂行する。

1. Rab の発現系の構築

哺乳細胞において Rab ファミリータンパク質は約 60 種が同定されており、細胞内の複雑な膜輸送系を時間的・空間的に制御していることが明らかとなっている。しかし、オートファジーにおける Rab の機能については未だ知見が少ない。そこで、網羅的に Rab の解析を行うため、Rab の可視化を行うための GFP 融合発現体、mCherry 融合発現体の作製や、miRNA-RNAi 発現系を用いたノックダウン系を構築する。発現体の構築はヒト上皮細胞ライブラリーや単球由来のライブラリーを用いて行う。

2. 細菌感染時のオートファゴソームに局在する Rab の同定

上記 1 で作製した Rab を発現させた細胞に A群レンサ球菌を感染させ、形成されるオートファゴソーム（マーカータンパク質として LC3 を使用する）と Rab との局在を、共焦点レーザー顕微鏡（現有設備）を用いて観察することで、細菌分解オートファジーに関わる Rab の同定を試みる

3. Rab のオートファジーにおける機能の解析

上記 1 で作製した Rab の恒常的 GDP 結合型（ドミナントネガティブ体）および恒常的 GTP 結合体（ドミナントアクティブ体）の変異体発現系も構築する。こうした変異体および miRNA-RNAi 発現系を用いた条件下で感染実験を行い、共焦点レーザー顕微鏡観察によりオートファゴソームの形成率、面積、リソソームとの融合率を測定することにより、その Rab がオートファゴソームの初期形成、拡大化、リソソームへの輸送など、どの段階を制御しているのかを調べる。また、感染後経時的に細胞溶解液を寒天培地に撒き、コロニー数を測定することで、細胞内生細菌数の推移を数値化する。

4. 菌感染生細胞を用いた Rab のオートファジー制御解析(タイムラップス観察)

生細胞のまま蛍光観察のできる共焦点レーザー顕微鏡（現有施設）を用いて、蛍光タンパク質を付した Rab やオートファゴソーム

マーカータンパク質を発現させた生細胞に菌を感染させ、生細胞のままタイムラプス撮影を行い、実際のオートファジーの膜動態の制御を可視化する。

5. Rab の新規エフェクター探索とその機能解析

プロテオーム解析によりオートファジー制御に関わる Rab のエフェクターを同定する。具体的には、MEF タグ (myc-TEV-Flag タグ) を付した活性型 Rab を細胞で発現させ、菌を感染後、免疫沈降法により活性型 Rab を精製し、共沈してきた相互作用因子を TOF-MAS により解析する。非感染細胞の結果と比較することで、感染時特異的なエフェクターの取得が可能となる。同定されたエフェクター候補タンパク質については、相互作用解析、ロックダウン解析により機能を明らかとする。

6. サルモネラ、リステリア、赤痢菌感染モデルでのオートファジー解析

項目 1 から 4 で明らかとなった機構が他の細菌に対するオートファジーにおいても共通の機構であるのかどうかを調べる。サルモネラ感染に関してはマクロファージ様細胞の RAW264.7 細胞を使用する。A 群レンサ球菌感染時同様に、菌を取り囲むオートファゴソームへの Rab の局在解析、miR-RNAi 発現系およびドミナントネガティブ体発現系を用いてオートファゴソームの形成率、面積、リソソームとの融合率、細胞内生細菌数を測定する。

4. 研究成果

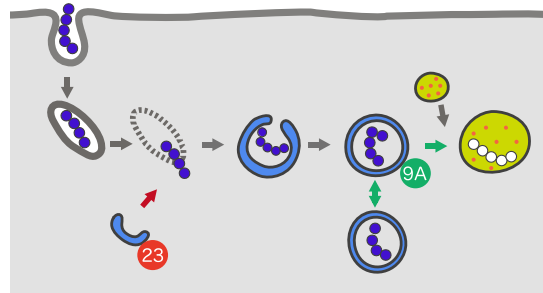
(1) 細菌分解オートファジーに関わる Rab GTPase の局在スクリーニング

哺乳細胞でこれまでに同定されている Rab GTPase 60 種について、EmGFP 融合タンパク質をクローニングし、それらと mCherry 融合オートファゴソームのマーカータンパク質 LC3 を発現させた HeLa 細胞に A 群レンサ球菌を感染させ、共焦点顕微鏡にて局在を観察を行った。各 Rab タンパク質のオートファゴソームに局在する割合を算出した。栄養飢餓時のオートファゴソームに局在する割合も算出した。この結果から、栄養飢餓時にはオートファゴソームに局在しないが、細菌感染時にはこれに局在する Rab タンパク質を明らかにした。

(2) Rab9A と Rab23 の機能解析

Rab9A と Rab23 の詳細な局在解析を行った結果、Rab9A は A 群レンサ球菌を分解するオートファゴソーム (GcAV と呼ぶ) に感染後期においてより高頻度で局在していた。さらに miR-RNAi システムにより Rab9A の発現を抑制した結果、菌の侵入率および GcAV の形成率は変化しなかったが、GcAV のサイズが有意に減少しており、GcAV とリソソームの融合も抑制されていた。加えて、菌の分解能も阻害されていた。また、GDP 結合変異体、GTP 結合変異体を用いて解析の結果、こうした Rab9A の局在・GcAV 拡大化・リソソーム融合は、GTPase 活性依存的であることが示された。一

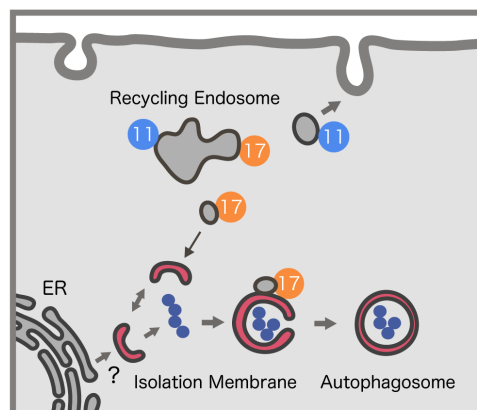
方で、Rab23 は感染前期の GcAV に高頻度で局在し、GcAV の形成自体への関与が示唆された。Rab9A と Rab23 はどちらも、栄養飢餓時のオートファゴソームには局在せず、ロックダウンの影響も観察されなかったことから、細菌分解時のオートファジーの特異的な制御因子のひとつであることが示唆された (下図)。この成果は Cellular Microbiology 誌に投稿した (2012)。



(3) Rab17 の機能解析

Rab17 は GcAV 上でドット状に局在しており、リサイクリングエンドソーム (RE) のマーカータンパク質であるトランスフェリンレセプター (TfR) とこのドット上で共同在を示した。生細胞のタイムラプス解析の結果、この Rab17 陽性ドットは成長する GcAV にリクルートし、融合していることが示された。また、Rab17 の活性変異体の発現により、GcAV-RE 融合および GcAV 形成が阻害され、菌の分解も抑制された。以上の結果から、Rab17 は RE-GcAV の融合を制御しており、RE は GcAV の重要な膜成分源の一つであることが示唆された。加えて、Rab17 の正の制御因子である Rabex-5 も同様に GcAV 上に局在し、ロックダウン解析により、RE-GcAV 融合に関与することが示された (下図)。

この成果は Cellular Microbiology 誌に投稿した (2014)。



(4) Rab30 の機能解析

Rab30 は感染時のみでなく、飢餓時においてもオートファゴソームに局在する Rab であることが新たに明らかになった。Rab30 は感染前はゴルジ体に局在し、ゴルジ体の形態維持に機能する。しかし感染時には、GcAV にリク

ルートし、GcAV 形成に關与していることが示唆された。Rab30 ノックダウンもしくは Rab30 の活性変異体発現細胞においては、形成された GcAV の形態(LC3 の局在バランス)が崩れていたことから、Rab30 は GcAV の膜安定化に寄与していることが示唆された。

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 5 件)

1. M. Okura, C. Lachance, M. Osaki, T. Sekizaki, F. Maruyama, T. Nozawa, I. Nakagawa, S. Hamada, C. Rossignol, M. Gottschalk, D. Takamatsu. Development of two-step multiple PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. 52:1714-9. 2014. (査読有)
2. Ito C, Saito Y, Nozawa T, Fujii S, Sawa T, Inoue H, ... & Arimoto H. Endogenous Nitrate Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria. Mol Cell. (2013). (査読有)
3. °T. Watanabe, T. Nozawa, C. Aikawa, A. Amano, *F. Maruyama, and I. Nakagawa. CRISPR regulation of intra-species diversification by limiting IS transposition and inter-cellular recombination. Genome Biol. Evol. 5:1099-114. 2013. (査読有)
4. °M. Okura, *D. Takamatsu, *F. Maruyama, T. Nozawa, I. Nakagawa, M. Osaki, T. Sekizaki, M. Gottschalk, Y. Kumagai, and S. Hamada. Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters from All Serotypes of *Streptococcus suis*: Potential Mechanisms for the Generation of Capsular Variation. Appl. Environ. Microbiol. 79:2796-2806. 2013. (査読有)
5. Nozawa T, Aikawa C, Goda A, Maruyama F, Hamada S, Nakagawa I. "The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group A *Streptococcus* infection." Cell Microbiol. 14:1149-65. (2012) (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. 野澤孝志, 野澤敦子, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路
"Atg5-independent/Rab9a-dependent target of intracellular group A streptococcus" 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 - 28 日, タワーホール船堀(東京)
2. Bijaya Haobam, 野澤孝志, 野澤敦子, 尾田誠一郎, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路
"Contribution of recycling endosome in Group A Streptococcus induced autophagosome formation" 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 - 28 日, タワーホール船堀(東京)
3. 尾田誠一郎, 野澤孝志, 野澤敦子, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路
"The Small GTPase Rab30 regulates anti-bacterial autophagy" 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 - 28 日, タワーホール船堀(東京)
4. Takashi Nozawa, Chihiro Aikawa, Shinichiro Oda, Akira Goda, Fumito Maruyama, and Ichiro Nakagawa
"Atg5-independent/Rab9A-dependent target of intracellular Group A Streptococcus"
FEMS 2013 (5th congress of european microbiologists), 2013. 7. 21-25, (ドイツ)
5. 野澤孝志, 相川知宏, 郷田瑛, 丸山史人, 中川一路 「A 群レンサ球菌によるオートファジーを制御する Rab タンパク質群」 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉県 2013 年 3 月 18 日
6. Takashi Nozawa, Chihiro Aikawa, Akira Goda, Fumito Maruyama, Ichiro Nakagawa 「The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group A *Streptococcus* infection」 第 11 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 兵庫県 2012 年 9 月 14 日
7. 野澤孝志 バクテリオファージによる宿主細菌への獲得免疫の付与 第 85 回日本細菌学会総会 長崎県 2012 年 3 月 28 日

〔図書〕(計1件)

Nozawa T and Nakagawa I. *Rab Proteins in Autophagy: Streptococcus Model*. Chapter contribution for the book “Autophagy, Infection and the Immune Response”. Wiley-Blackwell. 2014

〔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

<http://www.tmd.ac.jp/grad/bac/index.htm>

l

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野澤 孝志 (Nozawa, Takashi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・助教

研究者番号：10598858

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：