

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：82801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460522

研究課題名(和文) リポ多糖誘導性オートファジーを制御する小胞輸送機構の解析

研究課題名(英文) Membrane trafficking regulating LPS-induced autophagy

研究代表者

瀬戸 真太郎 (Seto, Shintaro)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部 免疫科・研究員(移行)

研究者番号：50383203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーを制御するPI3キナーゼの調節因子であるBeclin-1に結合するRab GTPaseを免疫沈降法で網羅的にスクリーニングした結果、Rab3B、Rab6C、Rab12、Rab13、Rab26がbeclin-1と結合していることを明らかにした。Rab26はリソソームに局在していることが明らかになった。また、Rab26ノックダウンマクロファージではLPS誘導オートファジーが亢進していることが明らかになった。以上の結果は、Rab26はRab39aと同様にBeclin-1に結合して、LPS誘導オートファジーを負に制御しているRab GTPaseであることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：We screened Rab GTPase for regulators of LPS-induced autophagy. We have already identified that Rab39a binds to Beclin-1, PI3 kinase regulator and negatively regulates LPS-induced autophagy. In this study, we found that Rab26 binds to Beclin-1 by immunoprecipitation analysis. Fluorescence microscopy analysis revealed that Rab26 localizes to lysosomes. Knock-down analysis showed that Rab26 negatively regulates LPS-induced autophagy.

研究分野：感染免疫

キーワード：オートファジー LPS Rab GTPase

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、LPS 誘導性オートファジーを制御する小胞輸送機構を解明することである。敗血症ショックは、グラム陰性細菌細胞壁成分である内毒素、LPS がマクロファージや単球、血管内皮細胞を刺激して、その結果産生される炎症性サイトカインによって起こる過剰反応である。一方で、過剰なサイトカイン産生はオートファジーを誘導することによって抑制されている。さらに、LPS によるオートファジー誘導機構は、貪食された微生物の殺菌、分解、および抗原提示能を促進することが知られている。近年、LPS 誘導性オートファジーにおける小胞輸送機構は、古典的オートファジー誘導機構とは異なることが明らかになりつつある。すなわち、LPS 誘導性オートファジーは、PI3 キナーゼ活性や Atg5 などの古典的オートファジー経路には依存的でないが、オートファジーアダプタータンパク質である p62/SQSTM1 (p62) に依存してオートファゴソーム形成が行われることが明らかになっている。

これまで、応募者は結核菌感染マクロファージにおける小胞輸送機構の解明を行ってきた。その過程において、ファゴソーム成熟を制御する Rab GTPase のひとつである Rab39a の LPS 誘導性オートファジーにおける機能を明らかにした。

以上の結果は、Rab39a は Beclin-1 に結合して、LPS 誘導性オートファジーを負に制御している因子であることを示唆する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LPS 誘導性オートファジーを制御する小胞輸送機構の解明することである。Small G protein である Rab GTPase に着目して、オートファジーを制御している PI3 キナーゼの調節因子である Beclin-1 に結合する Rab GTPase をスクリーニングして、Beclin-1 の制御因子を同定する。また、

Beclin-1 に結合する Rab GTPase の LPS 誘導性オートファジーにおける制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1. Rab GTPase ライブラリーの構築

Rab GTPase は 60 以上のファミリー遺伝子から構成されている。本研究では GFP 融合 Rab GTPase ライブラリーを構築した。

2. Beclin-1 と結合する Rab GTPase の同定

GFP 融合 Rab GTPase と HA タグ融合 Beclin-1 を発現する HEK293 細胞を用いて、抗 GFP 抗体で免疫沈降法を行った。

3. Rab26 の CRISPR/Cas9 によるノックアウトマクロファージ細胞の構築

LentiCRISPR/Cas9 を用いて、Rab26 ノックアウト Raw264.7 マクロファージを構築した。

4. レジオネラ菌の新規エフェクタータンパク質の同定

HEK293 細胞でレジオネラ菌のエフェクター候補タンパク質を発現して、免疫沈降法と LC-MS/MS によって、レジオネラ菌のエフェクター候補タンパク質に結合する宿主タンパク質をスクリーニングした。

4. 研究成果

Beclin-1 と結合する Rab GTPase の同定

これまでの研究で Rab39a は Beclin-1 に結合して、LPS 誘導性オートファジーを負に制御していることを明らかにしている。本研究では、新たな LPS 誘導性オートファジーを制御する Rab GTPase の探索を行った。免疫沈降法によって、Beclin-1 と結合することが明らかになった Rab GTPase として、Rab3B、Rab6C、Rab12、Rab13、Rab26 が明らかになった。また、これらの Rab GTPase のみを発現した HEK293 においても、免疫沈降法で Beclin-1 と結合することことも明らかにした。Rab26 は Rab39a と同様にリソソームに結合することを明らかにした。CRISPR/Cas9 によって、

Rab26 をノックアウトした Raw264.7 マクロファージでは LPS 誘導オートファジーが亢進していることが明らかになった。以上の結果は、Rab26 は新たに発見されたリソソーム局在する LPS 誘導性オートファジーを負に制御する因子であることを示す。

本研究過程で、レジオネラ菌の新規エフェクタータンパク質を宿主標的タンパク質と同時に同定する方法を開発した。

Legionella pneumophila (レジオネラ菌) は、レジオネラ肺炎やポンティアック熱の原因細菌である。レジオネラ肺炎は乳幼児や高齢者、易感染性宿主では重症化しやすく、無治療の場合において死亡率が高い (10-30%)。レジオネラ菌はマクロファージなどの食細胞に貪食されても、貪食された細胞内で増殖できる細胞内寄生性細菌である。レジオネラ菌は感染宿主細胞内でエフェクタータンパク質を分泌する。これらのエフェクタータンパク質によって、レジオネラ菌が含まれるファゴソームは小胞体様に改変されて、増殖ニッチが形成される。これまでの研究によって、Dot/Icm 分泌装置と呼ばれる IV 型分泌装置依存的にエフェクタータンパク質がレジオネラ菌体内から宿主細胞内に分泌されていることが明らかになっている。レジオネラ菌ゲノム上の約 3100 遺伝子のうち、400 遺伝子以上がエフェクタータンパク質であるが、その多くの機能は明らかになっていない。本研究では、これまで宿主細胞内で発現することが明らかになっている 275 のエフェクタータンパク質の宿主標的タンパク質を探索した。HEK293 細胞で FLAG タグ融合エフェクタータンパク質を発現させて、免疫沈降法でエフェクタータンパク質を精製した。精製したエフェクタータンパク質のトリプシン処理を行い、LC-MS/MS で解析することによって、エフェクタータンパク質に結合している宿主タンパク質を同定した。そ

の結果、25 以上の宿主標的タンパク質が明らかになっていなかった新規エフェクタータンパク質を明らかにすることができた。これらの宿主標的タンパク質には小胞体の小胞輸送に關与するタンパク質である VCP や COPI 複合体などが含まれる。以上の結果は、新規レジオネラエフェクタータンパク質候補とその宿主標的タンパク質を同定できることを示す。

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 1 件)

Oishi S, Takano R, Tamura S, Tani S, Iwaizumi M, Hamaya Y, Takagaki K, Nagata T, Seto S, Horii T, Osawa S, Furuta T, Miyajima H, Sugimoto K: M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. *Immunology*. 2016;149:320-328.

[学会発表](計 4 件)

瀬戸真太郎、永田 年: レジオネラ菌の新規エフェクタータンパク質とその標的宿主タンパク質の網羅的探索. 第 89 回日本細菌学会総会; 大阪, 2016 年 3 月.

瀬戸真太郎、慶長直人: 結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構. In: 第 91 回日本結核病学会総会; 金沢, 2016 年 5 月.

瀬戸真太郎, 森本耕三, 吉田 勤, 土方美奈子, 松下育美, 白石祐治, 永田 年, 倉島篤行, 慶長直人: プロテオミクス解析による肺 MAC 症肉芽腫の分子解剖. 第 90 回日本細菌学会総会; 仙台, 2017 年 3 月.

瀬戸真太郎，森本耕三，吉田 勤，土方美奈子，松下育美，白石祐治，倉島篤行，慶長直人：プロテオミクス解析による（多剤耐性）結核症、および Mycobacterium avium complex 症感染組織における特異的分子マーカーの探索．第 92 回日本結核病学会総会；東京，2017 年 3 月．

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

瀬戸真太郎（SETO SHINTARO）

公益財団法人結核予防会結核研究所生体防御部免疫科長

研究者番号：50383203

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし