

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02642

研究課題名(和文) Atg遺伝子によるオートファジー非依存的な機能の解明

研究課題名(英文) The role of Atg family members on autophagy independent pathway

研究代表者

笹井 美和 (SASAI, Miwa)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：30631551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー関連遺伝子はこれまで、オートファジーという現象を起こすための分子であると考えられてきたが、近年、個々のオートファジー関連遺伝子がオートファジーという現象とは全く異なる生命現象に個々に関連していることが報告され、注目されつつある。本研究では、Atg8ファミリー遺伝子の中でもGate-16とGABARAPが、Autophagyとは無関係に、細胞内でLPSを認識した際に活性化されるカスパーゼ11依存的な非標準インフラマソームの活性化制御機構に関与し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

インフラマソームは細菌の出す毒素や金属・結晶などによる細胞傷害といった生体における異物や異変などを認識すると活性化し、強い炎症性サイトカインや細胞死を誘導する免疫システムであるが、その活性化は厳密に制御された状況下でないと、自己免疫疾患を誘導してしまうことが知られている。本研究では、インフラマソームの中でも細胞内LPSを認識してカスパーゼ11が活性化される非標準インフラマソームが、一部のAtg8遺伝子によって負に制御されていることを証明したことから、自己免疫疾患の発症を抑えている新たな分子を同定したことになり、この遺伝子の変異は自己免疫疾患の発症となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy-related genes have been considered to be molecules that are responsible for the phenomenon of Autophagy. Recently, however, individual autophagy-related genes have been reported to be individually involved in biological phenomena that are completely different from the phenomenon of Autophagy. In this study, we found that Gate-16 and GABARAP, among the Atg8 family genes, are involved in the negative regulation of the caspase-11-dependent non-canonical inflammasome, which is activated upon recognition of LPS in the cell.

研究分野：免疫

キーワード：オートファジー非依存的 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞が飢餓に陥った際に自分の中にあるものを分解して栄養を捻出して生き抜く機構として知られており、オートファジーは酵母からヒトに至る真核生物まで保存されている生命現象である。この現象は、オートファジー関連遺伝子(Autophagy related genes: Atgs)と総称される遺伝子群によりその機能が精密に制御されており、各 Atgs の遺伝子改変細胞や遺伝子改変マウスを用いた解析から、オートファジーは様々な現象に関与していることが暗示されていた。しかし、多くの Atgs 遺伝子はオートファジーに必須の遺伝子であるため、Atg の欠損により見られる表現系はオートファジーの機能が欠落した結果であるとの先入観が先行し、Atg 遺伝子のオートファジー以外の機能はあまり注目されてこなかった。しかし、各々の Atg 遺伝子の機能的変異体などを用いた解析により、オートファジーという現象以外にも個々の Atg 遺伝子に固有の機能がある事例が多々見受けられてきており、Atg 遺伝子によるオートファジー非依存的な機能の存在が垣間見えてきているが、多くは未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は Atg 遺伝子のオートファジー以外の機能を解明することを目的としている。研究代表者は様々な予備的知見を得ていたが、ここでは Atg8 遺伝子による炎症生サイトカイン産生の制御について報告する。Atg8 ファミリーはマウスでは LC3B に代表される LC3 ファミリー(LC3A, LC3B)と GABARAP ファミリー(Gate-16, GABARAP, GABARAPL1)から構成されており、研究代表者は先の研究で GABARAP ファミリーの中でも Gate-16/GABARAP が細胞内小胞の局在を制御することにより IFN-γ 依存的な抗トキソプラズマ応答に関与していることを明らかにしていたが [1]、他の生命現象に関与しているかどうかは未解明であった。そこで、GABARAP ファミリーが他の生命現象にオートファジー非依存的に関与しているかについて検討した。

3. 研究の方法

Atg8 ファミリーのオートファジー以外の機能について検討するため、それぞれの Atg8 ファミリー単独欠損マウスならびに二重欠損マウスを作成し、それぞれのマウスから細胞を単離して、Atg8 ファミリーのオートファジー以外の機能、ここでは特に細胞内 LPS を認識した際の Caspase-11 依存的なインフラマソーム活性化における機能について検討した。

4. 研究成果

(1)Gate-16/GABARAP はカスパーゼ 11 インフラマソームを負に制御していた

インフラマソームとは細胞質内の異物(病原性微生物の成分や結晶など)を認識して炎症応答を誘導する経路のことであり、NOD-like receptor(NLR)や Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD(ASC)を介してカスパーゼ(caspase)を活性化し、炎症性サイトカインである IL-1β や IL-18 を誘導するだけでなく、パイロプトーシスと呼ばれる細胞死を誘導することが知られている。研究代表者は先の研究で GABARAP ファミリーの一部が

IFN-γ 依存的な抗トキソプラズマ応答に関与していることを明らかにしていたが、IFN-γ 誘導性の遺伝子で抗トキソ

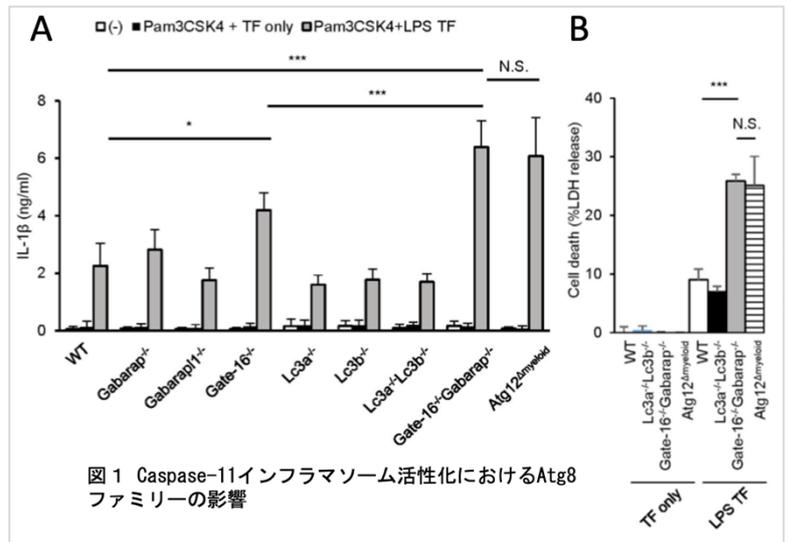


図1 Caspase-11インフラマソーム活性化におけるAtg8ファミリーの影響

プラズマ応答にも関与していた GBP が、細胞内 LPS 認識を介した Caspase-11 依存的なインフラマソームの活性化に関与していることが報告されたことから、GABARAP ファミリーもインフラマソームの活性化に関与しているかと考えた。そこで、Atg8 ファミリー単独または二重欠損マウスより骨髄由来マクロファージを誘導し、細胞内 LPS を介した Caspase-11 インフラマソームの活性化について検討した結果、Atg8 ファミリーの中でも Gate-16 欠損細胞で IL-1 β の産生が亢進し、Gate-16/GABARAP の二重欠損細胞ではさらに IL-1 β の産生が亢進しており (図 1. A)、Caspase-11 依存的なパイロプトシスも同様の傾向が見られた (図 1. B) ことから、Atg8 ファミリーの中でも Gate-16 と GABARAP が細胞内 LPS 認識によるカスパーゼ 11 インフラマソームを負に制御している事が示唆された。同じ Atg8 ファミリーではあるが、LC3 ファミリーの LC3A、LC3B、及び LC3A/LC3B 二重欠損細胞においては、IL-1 β の産生亢進やパイロプトシスの亢進は認められなかったことから、Gate-16/GABARAP 欠損による細胞内 LPS 刺激による Caspase-11 インフラマソームの活性化の亢進は、オートファジーではなく、Gate-16/GABARAP 独自の機能であることが示唆された。

(2) Gate-16/GABARAP 二重欠損細胞では ASC が凝集体を形成していた

GABARAP ファミリー欠損細胞における Caspase-11 インフラマソームの活性化亢進のメカニズムを解明するため、Caspase-11 インフラマソームの活性化に関与していることが既に報告されている ASC の細胞内での動向について共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。その結果、Gate-16/GABARAP 二重欠損細胞では細胞内に LPS を移入した際、Caspase-11 インフラマソームの活性化に重要な役割を果たしている ASC が細胞質内で凝集体を形成していることが明らかとなった (図 2. A, B)。

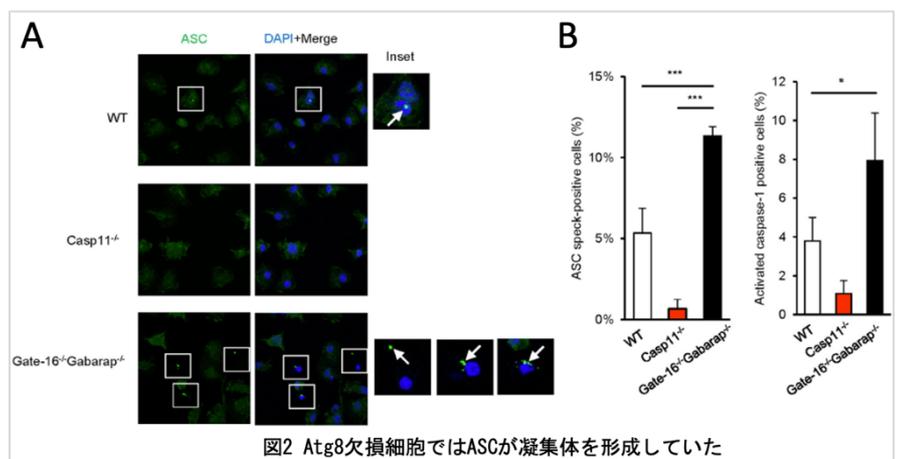


図2 Atg8欠損細胞ではASCが凝集体を形成していた

(3) Gate-16/GABARAP は GBP2 の上流で Caspase-11 インフラマソームの活性化制御に関与していた

IFN 誘導性 GTPase 群の中でも GBP ファミリー複数のファミリー分子がタンデムに配列されておりマウスではクロモソーム 3(chr3)とクロモソーム 5 (chr5)に存在している。クロモソーム(Chr)3 に局在している GBP ファミリーを全て欠損させたマウス由来の細胞では細胞内 LPS を介した Caspase-11 インフラマソームの活性化が激減することが報告されていたことから、Chr3 に局在

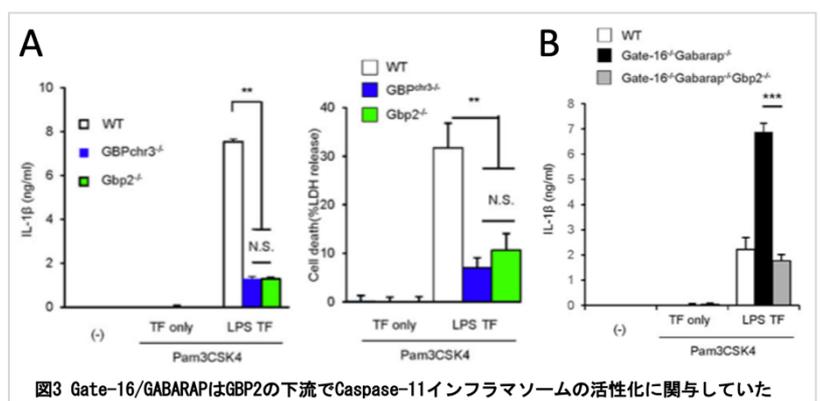


図3 Gate-16/GABARAPはGBP2の下流でCaspase-11インフラマソームの活性化に関与していた

している GBP の中でもどの GBP が細胞内 LPS を介した Caspase-11 インフラマソームの活性化に関与しているのかを明らかにするため、Chr3 に局在している個々の GBP ファミリー分子の遺伝子改変マウスを作成して実験を行なった。遺伝子改変マウスから骨髄由来マクロファージを誘導し、細胞内 LPS によって Caspase-11 インフラマソームを活性化させたところ、GBPchr3 ファミリーの中でも GBP2 単独欠損細胞では、GBPchr3 欠損細胞と同レベルしか IL-1 β は産生されず、パイロプトシスも同程度しか誘導されなかったことから、GBP ファミリーの中でも GBP2 が細胞内 LPS を介した Caspase-11 インフラマソームの活性化に関与していることが明らかとなった

(図 3. A)。また、Gate-16/GABARAP の欠損による細胞内 LPS を介した Caspase-11 インフラマソームの活性化亢進は、GBP2 との三重欠損にすることにより見られなくなったことから、Gate-16/GABARAP は GBP2 の上流でインフラマソームの活性化制御に関与していることが示唆された (図 3. B)。

(4) Gate-16/GABARAP は生体内における細胞内 LPS を介した Caspase-11 インフラマソームの活性化に GBP2 の上流で関与していた

最後に、Gate-16/GABARAP による細胞内 LPS を介した Caspase-11 インフラマソームの活性化制御が生体内でも機能しているかについて検証した。マウス生体に LPS 投与を介して Caspase-11 経路を活性化させた際の血清中の IL-1 β と IL-6 の産生は、Gate-16/GABARAP 二重欠損マウスでは、顕著に産生量の増加が認められ、その産生増加は Gate-16/GABARAP/GBP2 の三重欠損マウス

では消失することが明らかとなり (図 4. A)、マウスの生存率に関しても、Gate-16/GABARAP 二重欠損マウスは顕著に死亡するのに対して、Gate-16/GABARAP/GBP2 の三重欠損マウスではその死亡率は低下した (図 4. B)。

以上の結果から、Atg8 ファミリーの中でも Gate-16/GABARAP は、細胞内 LPS を介した Caspase-11 インフラマソームの活性化を GBP2 の局在を制御することにより、負に制御していることが明らかとなった。本研究の成果は 2020 年に *Frontiers in Immunology* に報告した [2]。

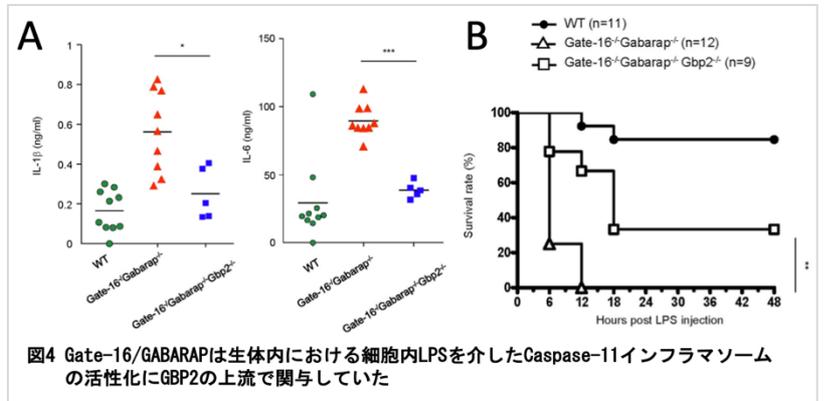


図4 Gate-16/GABARAPは生体内における細胞内LPSを介したCaspase-11インフラマソームの活性化にGBP2の上流で関与していた

1. Sasai, M., Sakaguchi, N., Ma, J.S., Nakamura, S., Kawabata, T., Bando, H., Lee, Y., Saitoh, T., Akira, S., Iwasaki, A., et al. (2017). Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nature immunology* 18, 899-910. 10.1038/ni.3767.
2. Sakaguchi, N., Sasai, M., Bando, H., Lee, Y., Pradipta, A., Ma, J.S., and Yamamoto, M. (2020). Role of Gate-16 and Gabarap in Prevention of Caspase-11-Dependent Excess Inflammation and Lethal Endotoxic Shock. *Front Immunol* 11, 561948. 10.3389/fimmu.2020.561948.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Nishiyama Saishi, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 75
2. 論文標題 T cell-derived interferon- is required for host defense to	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102049 ~ 102049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.102049	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 Lee Youngae, Yamada Hiroshi, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Okamoto Masaaki, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Standley Daron M, Sasai Miwa, Takei Kohji, Yamamoto Masahiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Initial phospholipid-dependent Irgb6 targeting to Toxoplasma gondii vacuoles mediates host defense	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e549 ~ e549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900549	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 Bando Hironori, Pradipta Ariel, Iwanaga Shiroh, Okamoto Toru, Okuzaki Daisuke, Tanaka Shun, Vega-Rodriguez Joel, Lee Youngae, Ma Ji Su, Sakaguchi Naoya, Soga Akira, Fukumoto Shinya, Sasai Miwa, Matsuura Yoshiharu, Yuda Masao, Jacobs-Lorena Marcelo, Yamamoto Masahiro	4. 巻 216
2. 論文標題 CXCR4 regulates Plasmodium development in mouse and human hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1733 ~ 1748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20182227	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 Bando Hironori, Lee Youngae, Sakaguchi Naoya, Pradipta Ariel, Sakamoto Ryoma, Tanaka Shun, Ma Ji Su, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Toxoplasma Effector GRA15-Dependent Suppression of IFN- -Induced Antiparasitic Response in Human Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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) 10.3389/fcimb.2019.00140	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 Kim Jin Kyung, Kim Yi Sak, Lee Hye-Mi, Jin Hyo Sun, Neupane Chiranjivi, Kim Sup, Lee Sang-Hee, Min Jung-Joon, Sasai Miwa, Jeong Jae-Ho, Choe Seong-Kyu, Kim Jin-Man, Yamamoto Masahiro, Choy Hyon E., Park Jin Bong, Jo Eun-Kyeong	4. 巻 9
2. 論文標題 GABAergic signaling linked to autophagy enhances host protection against intracellular bacterial infections	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06487-5	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 Bando Hironori, Lee Youngae, Sakaguchi Naoya, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Cai Yihong, Liu Jianfa, Shen Jilong, Nishikawa Yoshifumi, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for Toxoplasma GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01738-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01738-18	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 Bando Hironori, Sakaguchi Naoya, Lee Youngae, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Lai De-Hua, Liu Jianfa, Lun Zhao-Rong, Nishikawa Yoshifumi, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Toxoplasma Effector TgIST Targets Host IDO1 to Antagonize the IFN- γ -Induced Anti-parasitic Response in Human Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 e2073-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.02073	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 Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 217
2. 論文標題 Decision by injection without infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20192145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20192145	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 Nakamura S, Shigeyama S, Minami S, Shima T, Akayama S, Matsuda T, Esposito A, Napolitano G, Kuma A, Namba-Hamano T, Nakamura J, Yamamoto K, Sasai M, Tokumura A, Miyamoto M, Oe Y, Fujita T, Terawaki S, Takahashi A, Hamasaki M, Yamamoto M, Okada Y, Komatsu M, Nagai T, Takabatake Y, Xu H, Isaka Y, Ballabio A, Yoshimori T	4. 巻 22
2. 論文標題 LC3 lipidation is essential for TFEB activation during the lysosomal damage response to kidney injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1252 ~ 1263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-020-00583-9	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 -

1. 著者名 Sakaguchi Naoya, Sasai Miwa, Bando Hironori, Lee Youngae, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Yamamoto Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of Gate-16 and Gabarap in Prevention of Caspase-11-Dependent Excess Inflammation and Lethal Endotoxic Shock	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 561948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.561948	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 Kim Sup, Lee June-Young, Shin Seul Gi, Kim Jin Kyung, Silwal Prashanta, Kim Young Jae, Shin Na-Ri, Kim Pil Soo, Won Minh, Lee Sang-Hee, Kim Soo Yeon, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro, Kim Jin-Man, Bae Jin-Woo, Jo Eun-Kyeong	4. 巻 17
2. 論文標題 ESRRA (estrogen related receptor alpha) is a critical regulator of intestinal homeostasis through activation of autophagic flux via gut microbiota	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 2856 ~ 2875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1847460	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 Pradipta Ariel, Bando Hironori, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Plasmodium UIS3 avoids host cell-autonomous exclusion that requires GABARAPs but not LC3 and autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102335 ~ 102335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102335	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 Pradipta Ariel, Sasai Miwa, Motani Kou, Ma Ji Su, Lee Youngae, Kosako Hidetaka, Yamamoto Masahiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Cell-autonomous Toxoplasma killing program requires Irgm2 but not its microbe vacuolar localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000960-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000960	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 Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 89
2. 論文標題 Anti-Toxoplasma host defense systems and the parasitic counterdefense mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102593 ~ 102593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2022.102593	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 Nakamura J, Yamamoto T, Takabatake Y, Namba-Hamano T, Minami S, Takahashi A, Matsuda J, Sakai S, Yonishi H, Maeda S, Matsui S, Matsui I, Hamano T, Takahashi M, Goto M, Izumi Y, Bamba T, Sasai M, Yamamoto M, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Nakamura S, Yoshimori T, Ballabio A, Isaka Y	4. 巻 8
2. 論文標題 TFEB-mediated lysosomal exocytosis alleviates high-fat diet induced lipotoxicity in the kidney	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1252-1263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.162498	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Miwa Sasai, Naoya Sakaguchi, Masahiro Yamamoto
2. 発表標題 GABARAP Autophagy Proteins Prevent the Caspase-11-Dependent Excess Inflammation and Lethal Endotoxic Shock
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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			
韓国	Chungnam National University	Korea Basic Science Institute	Korea Research Institute	