

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790413

研究課題名（和文） 細胞侵入性細菌感染によるオートファジー認識・回避機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of pathogen recognition mechanism in autophagy, and analysis of bacterial evasion mechanism from autophagic recognition.

研究代表者

小川 道永 (OGAWA MICHINAGA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80361624

研究成果の概要（和文）：

本研究では細胞内運動性細菌であるリステリア菌および赤痢菌に対するオートファジー認識・回避機構を詳細に解析した結果、(1)  $\Delta$ ActA 株は宿主の Ub-p62-LC3 経路によりオートファジー認識されること、(2) リステリア菌の菌体表面に存在する ActA がリステリア菌のオートファジー認識の回避に必要なこと、(3) Atg5 と相互作用する新規タンパク質 Afp が赤痢菌を標的とするオートファジーに関与していること明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We found that *Listeria monocytogenes* ActA, a surface protein required for actin polymerization and actin-based bacterial motility, plays a pivotal role in evading autophagy, but in a manner independent of bacterial motility. *L. monocytogenes* expressing ActA mutants that lack the ability to recruit the host proteins initially underwent ubiquitylation, followed by recruitment of p62 and LC3, before finally undergoing autophagy. We found that the involvement of Afp, newly discovered Atg5-interacting protein, in autophagy targeting *Shigella*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 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：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：病原性・赤痢菌

## 1. 研究開始当初の背景

近年までオートファジーは細胞内において恒常的に起きている現象であり、細胞内の

不要なタンパク質やオルガネラを非特異的にバルク分解する機構であると考えられていた。しかし最新の研究結果から、オートフ

ファジーが不要になったオルガネラ、不溶タンパク質凝集体、病原菌などを選択的に認識して分解しているという報告が多くなされており、オートファジーの役割は細胞の恒常性の維持のみならず、発生・分化、細胞死、自然免疫など多岐にわたることが明らかになってきている。一方で、本研究代表者は赤痢菌感染において観察されるオートファジーは、赤痢菌の細胞内でのアクチンコメットの形成に必須因子である VirG タンパク質が宿主細胞のオートファジーに必須のタンパク質である Atg5 により認識されることにより誘導されることを 2005 年に報告しているが、病原細菌に対するオートファジーにおける認識機構に関する報告はそれ以外に全くなされていない。赤痢菌と同様に細胞内運動性細菌である *L. monocytogenes* も赤痢菌と同様にオートファジーを積極的に回避している可能性が高く、実際に本研究代表者はリステリア菌の菌体表面に存在し、リステリア菌の細胞内運動性に必須のタンパク質である ActA がオートファジーによる認識の回避に必要であるという結果を得ている。これらの結果を踏まえて、本研究では *L. monocytogenes* のオートファジー回避機構およびその認識機構を明らかにすることを企図した。さらに、オートファジーに必須の因子である Atg5 と結合する新規タンパク質 Afp を見出し、現在までに Afp が赤痢菌感染およびアミノ酸飢餓条件下において観察されるオートファゴソームに特異的に局在することを見出しており、このことは赤痢菌感染によるオートファゴソームの形成において Afp が重要な役割を果たしていることを示している。Afp の機能解析を詳細に行うことにより、赤痢菌に対するオートファジーのメカニズムがさらに明らかになることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では (1) 赤痢菌と同様に細胞侵入後に細胞質へと離脱し、アクチンコメットを形成することが知られている *L. monocytogenes* におけるオートファジー回避機構の解析を行う。具体的には *L. monocytogenes* 感染によって観察されるオートファジーにおける菌側のオートファジー誘導因子および阻害因子、さらには宿主側の認識因子の探索を行う。(2) 赤痢菌感染におけるオートファジーにおいて基質認識分子として機能している Atg5 と結合する宿主因子として本研究代表者が見出している新規タンパク質 Afp が赤痢菌のオートファジーにおいて果たす役割を詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) リステリア菌によるオートファジーの阻害機構の解析

予備検討によりオートファゴソームのマーカーである LC3 を発現させた MDCK 細胞に *L. monocytogenes* の野生株または ActA 欠損株 ( $\Delta actA$ ) を感染させた結果、 $\Delta actA$  感染細胞において菌体への LC3 の集積が観察されたことから、*L. monocytogenes* の感染によって誘起されるオートファジーは ActA によって阻害されるという仮説を立て、ActA によるオートファジー阻害機構に焦点を絞って解析を行った。菌体表面に露出している ActA タンパク質は *L. monocytogenes* の細胞内運動に必須の病原因子であり、Arp2/3、VASP、F-アクチンと結合することが報告されている。そこで、本研究ではこれらのタンパク質との結合領域を欠失した変異 ActA タンパク質を発現する変異株を作成し、ActA 上オートファジー認識阻害責任領域の同定を行い、ActA によるオートファジー回避メカニズムを明ら

かにした。さらに、 $\Delta actA$ 株に対するオートファジー認識機構に焦点を当てて解析を行った。 $\Delta actA$ 株は宿主細胞侵入後に菌体表面がユビキチン化を受けることが報告されていることから、ポリユビキチンと LC3 の双方に結合することが知られている p62/SQSTM1 が  $\Delta actA$  株のオートファジー認識に関与していることが予想された。そこで、ポリユビキチン-p62-LC3 を中心に  $\Delta actA$  株に対するオートファジー認識機構の解析を進めた。具体的には p62<sup>-/-</sup>MEF、Atg5<sup>-/-</sup>MEF 細胞を用いて  $\Delta actA$  株周囲へのユビキチン、p62、LC3 の局在を調べた。さらに、ポリグルタミンや GFP-170\* といった易凝集性タンパク質と ActA のキメラタンパク質を用いた再構成実験を行い、易凝集性タンパク質のユビキチン化、それに続く p62 の集積に対する ActA の阻害効果を検証した。

#### (2) 赤痢菌感染により誘導されるオートファジーにおける Afp の機能解析

GFP 等のタグを付与した Afp タンパク質を培養細胞に発現させ、赤痢菌感染により形成されるオートファゴソームと Afp、Atg5、LC3 との局在性をコンフォーカルレーザー顕微鏡および CCD カメラ付き蛍光顕微鏡(タイムラプス)により経時的に観察することによって、赤痢菌感染細胞における Afp の細胞内動態を明らかにした。さらに、siRNA を用いて Afp の発現をノックダウンし、赤痢菌により誘導されるオートファジーに与える影響を精査した。具体的には赤痢菌感染時に菌体周囲での隔離膜の形成・伸展、Atg5-Atg12 の局在、LC3 の局在、リソソームとの融合、オートファゴソーム内の菌体の分解というオートファジーの各段階における Afp のノックダウンの影響を精査した

#### 4. 研究成果

##### (1) リステリア菌によるオートファジーの阻

#### 害機構の解析

リステリアの菌体表面に存在し、リステリアの細胞内運動性に必須のタンパク質である ActA の新たな機能として、リステリア菌のオートファジー認識の回避に重要な役割を果たしていることが明らかになった。具体的には、① ActA が細胞内運動性に必要な二つの主要な宿主タンパク質である Arp2/3 複合体および VASP を集積して菌の細胞壁全周を覆うことでオートファジー認識機構から回避していること、② ActA が宿主タンパク質と結合できない場合、菌体が直接ユビキチン化され、ポリユビキチン鎖が p62 を介して LC3 と結合し、菌体はオートファジーにより認識されること、③ ポリグルタミンや GFP-170\* といった易凝集性タンパク質と ActA のキメラタンパク質を用いた再構成実験の結果、ActA による宿主タンパク質集積機能により易凝集性タンパク質のユビキチン化および p62 による凝集体の形成が阻害されることが明らかになった(図1)。

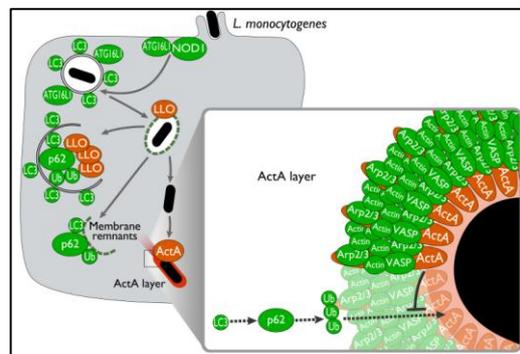


図1 リステリア菌ActAによるオートファジー回避機構

##### (2) 赤痢菌感染により誘導されるオートファジーにおける Afp の機能解析

赤痢菌感染により誘導されるオートファジーにおける Atg5 と相互作用する新規のタンパク質 Afp の機能を解析した結果、赤痢菌感染細胞において Afp はユビキチン Ub 非依存的に菌体周囲へリクルートされ、Atg5 や LC3 と phagophore 上で共局在することを明ら

かにした。さらに、Afp はサルモネラ菌や A 群連鎖球菌を標的とするオートファゴソームにも局在することを明らかにした。Afp ノックダウン細胞では赤痢菌を標的としたオートファジーが低下し、それに伴い Afp ノックダウン細胞では赤痢菌の細胞内増殖が大幅に低下することを見出した。このことは、Afp が赤痢菌のみならずサルモネラ菌など他の病原菌に対するオートファジーにおいても重要な働きを有していることを示している。

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 12 件)

- 1 Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Hain, T., Chakraborty, T. & Sasakawa, C. Autophagy targeting of *Listeria monocytogenes* and the bacterial countermeasure. *Autophagy* **7** (2011).
- 2 Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Suzuki, S., Sanada, T., Punginelli, C., Mimuro, H. & Sasakawa, C. *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. *Curr Opin Microbiol* **14**, 16-23 (2011).
- 3 Kim, M., Ogawa, M., Mimuro, H. & Sasakawa, C. Reinforcement of epithelial cell adhesion to basement membrane by a bacterial pathogen as a new infectious stratagem. *Virulence* **1**, 52-55 (2010).
- 4 Kim, M., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H. & Sasakawa, C. Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe* **8**, 20-35 (2010).
- 5 Ashida, H., Kim, M., Schmidt-Supprian, M., Ma, A., Ogawa, M. & Sasakawa, C. A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response. *Nat Cell Biol* **12**, 66-73; sup pp 61-69 (2010).
- 6 小川道永、笹川千尋. *Shigella* strategy for host defense and mucosal infection. 蛋白質核酸酵素 **54**, 988-995 (2009).
- 7 小川道永、吉川悠子、笹川千尋. 細菌感染とオートファジー. 臨床検査 **53**, 1569-1575 (2009).
- 8 Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., Kakizuka, A., Sztul, E., Chakraborty, T. & Sasakawa, C. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* **11**, 1233-1240 (2009).
- 9 Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Chakraborty, T. & Sasakawa, C. *Listeria monocytogenes* ActA is a key player in evading autophagic recognition. *Autophagy* **5**, 1220-1221 (2009).
- 10 Ogawa, M., Nakagawa, I., Yoshikawa, Y., Hain, T., Chakraborty, T. & Sasakawa, C. *Streptococcus*-, *Shigella*-, and *Listeria*-induced autophagy. *Methods Enzymol* **452**, 363-381 (2009).
- 11 Kim, M., Ogawa, M., Fujita, Y., Yoshikawa, Y., Nagai, T., Koyama, T., Nagai, S., Lange, A., Fassler, R. & Sasakawa, C. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature* (2009).
- 12 Ashida, H., Ogawa, M., Mimuro, H. & Sasakawa, C. *Shigella* infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system. *Curr Top Microbiol Immunol* **337**, 231-255 (2009).

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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◇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

小川 道永 (OGAWA MICHINAGA)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：80361624

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：