

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293370

研究課題名(和文)細菌感染によるAtg5依存・非依存オートファジーの分解と炎症誘導メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of Atg5 dependent and independent autophagy and induction mechanism of inflammation during bacterial infection.

研究代表者

中川 一路 (NAKAGAWA, ICHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70294113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、哺乳類細胞においては、飢餓時に細胞内のアミノ酸供給に働くだけでなく、異常タンパク質や老化した細胞内器官の分解、細胞内に侵入した微生物の分解にも機能する。この、微生物の分解については、生理的なオートファジーと異なる点が見いだされるが、その膜生成に関わるオートファジーには、通常とは異なる様々なRabタンパク質が用いられていることが明らかとなった。A群レンサ球菌のモデルでは、Rab9A、Rab23だけでなくRab17、Rab30といった様々なRabタンパク質が利用されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy in mammalian cells not only supplies nutrients under starvation conditions but also protects against human diseases by selectively degrading aggregated proteins, damaged organelles, and invading microbes. Rab proteins are localized to distinct intracellular membranes and vesicles and function as molecular switches that alternate between two conformational states. We found that GcAV-regulating Rab proteins include Rab9A and Rab23, which are dispensable for starvation-induced autophagy. Autophagy involves highly conserved cellular machinery, has various physiological roles, and plays a role in immunity against intracellular pathogens. Our findings suggest that autophagy uses involves Rab proteins during distinct stages of development. Further studies examining autophagy during GAS infection will help define these detailed interactions between host cells and bacterial pathogens.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 xenophagy オートファジー Rabタンパク質 炎症

1. 研究開始当初の背景

本研究では、細菌感染時の菌体排除・免疫誘導機構として注目されるオートファジーについて、Atg5 依存性の選択性オートファジーと Atg5 非依存性の Rab9 により誘導される代替性オートファジーの菌体認識・分解に関わる分子機構を明らかとする。この機構を明らかとすることで、i) 細胞内に侵入した菌を分解して排除するための機構、ii) 細胞内での菌の動態を菌種別に高精度に感知して、有効な炎症・免疫誘導・抑制を行うためのスイッチング機構としての機能、iii) 菌体を効率良く排除するために Atg5 依存性・非依存性双方の膜誘導を制御するための機構を解明することとなり、様々な細菌感染症に対する生体の新たな防御機構の制御を可能とするだけでなく、創薬標的の同定、種々の細菌感染症の発症メカニズムの解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

病原性細菌の病原性の発揮には、宿主組織への付着により生体組織に定着することが重要である。そのため、生体を広く覆う上皮や粘膜といった組織は、これらの菌の侵入を感知する最前線の組織でありかつ最大の防御組織となっている。申請者は、非食食系のこのような宿主細胞内に取り込まれた A 群レンサ球菌が、通常のエンドソーム・リソソーム系以外に、細胞内の小器官などを分解する自食作用（オートファジー）により分解され細胞内での新たな免疫系として機能していることを明らかとしてきた (Nakagawa et al. Science, 2004)。その後、赤痢菌、サルモネラ、リステリアなどの様々な細胞侵入性細菌に対して免疫機構を示すことが報告されており、従来考えられてきたオートファジーではなく選択性オートファジー (selective autophagy) として、また炎症系や抗原提示など他の免疫系とのつながりも明らかとなってきた (Levine B, et al., Nature 2011)。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、様々な菌体成分や危険物質を認識する分子群 (PAMPs, DAMPs) に対するレセプターが同定され、オートファジーと関連するシグナル経路が少しずつ明らかとなってきた (Deretic, J. Immunol 2012、Tang et al. Immunological Review 2012, Kuballa et al, Annu. Rev. Immunol. 2012) しかし、免疫系におけるオートファジーの役割、特に菌の分解と炎症反応を制御するシステムについては、その詳細は明らかとさ

れていない。これまで、オートファジーについては、細胞内での膜の新生を伴う分子群について機能解析が進められ、Atg5/Atg7 に依存するオートファジーがその中心であることが示されてきた。ところが、2009 年になり、この Atg5 に依存しないオートファジーの誘導機構が新たに報告され、Rab9 を介した代替性オートファジー (alternative autophagy) として、注目を集めている (Nishida et al. Nature 2009, Shimizu et al. Autophagy 2010)。申請者らは上記の細菌感染特異的に誘導されるオートファジーの分子メカニズムを解析する過程で、細胞内の小胞輸送に必須である Rab5 と Rab7 が A 群レンサ球菌を取り囲むオートファゴソームの融合に必須であること、また Rab9 と Rab23 が細菌特異的に誘導されるオートファゴソーム形成そのものに必須であることを明らかとした (図 1)。さらに、細胞内の菌体成分認識分子である NLRX1 が、活性酸素の誘導を介して炎症反応とオートファゴソーム形成を制御していることを明らかとしてきた。しかし、代替性オートファジーで必須とされる Rab9 が、なぜ細菌感染時の選択性オートファジーで必須となるのか、また、その過程における炎症の惹起・抑制といった制御機構については、明らかとされていない。そのため、細菌感染におけるオートファジーの誘導については、i) 細胞内に侵入した菌を分解して排除するための機構だけでなく、ii) 細胞内での菌の動態を菌種別に高精度に感知して、有効な炎症・免疫誘導・抑制を行うためのスイッチング機構としての機能、iii) 菌体を効率良く排除するために Atg5 依存性・非依存性双方の膜誘導の制御機構という 3 つの大きな役割を担い、これらは厳密に制御されているのではないかと、この着想に至った。本研究では、Atg5 に依存する選択性オートファジーと Atg5 非依存性に Rab9 により制御される代替性オートファジーの誘導機構のそれらの生体防御機構における役割、特に菌体排除機構と炎症惹起機構における役割を明らかとすることを目的として、以下の解析を行う。(1) Atg5 依存・非依存性のオートファジー誘導に必要な PAMPs, DAMPs を認識する分子の同定。(2) Atg5 依存・非依存的に誘導される A 群レンサ球菌特異的オートファジーの分子メカニズム解明。特に、Rab9 と結合する分子の網羅的な解析、また同様に A 群

レンサ球菌感染時に必須となる Rab23 と結合する分子の網羅的な解析によりそのネットワークを解明する。

(3)A 群レンサ球菌感染に特異的な代替性オートファジーに誘導に必須な菌体成分の解明。上記(1)によって明らかとされる宿主側因子の標的となる菌体側分子を明らかとする。これは、すでに申請者によって、A 群レンサ球菌の菌体表層分子・分泌タンパクなどの遺伝子破壊株ライブラリーが構築されているため、種々の変異菌株の感染時に誘導されるオートファジーを共焦点顕微鏡あるいは電子顕微鏡を用いることで微細構造を解析し、上記(1)、(2)で明らかとなる分子との相互作用について詳細な解析を行う。

A 群レンサ球菌によって誘導される選択性オートファジーおよび飢餓により誘導される通常のオートファジーの免疫応答への関連について、Atg5 ノックアウト細胞、Rab9 ノックアウト細胞を用いて、炎症性サイトカインなどの遺伝子発現パターンの解析と ELISA を用いた定量解析を行う。また、これらの KO マウスを用いた感染モデルを構築することで、*in vivo* で感染に対する評価を行う

3. 研究の方法

全体の研究計画としては、はじめに A 群レンサ球菌感染時に誘導される Atg5 依存性、Atg5 非依存性 2 つのオートファジーの誘導に必要な PAMPs, DAMPs を認識する分子とその機能を明らかにすることを目標とする。さらに、これらのオートファジーによって誘導される免疫反応、とくに炎症応答の制御について、詳細な解析を行うことを予定している。名を研究協力者として本提案を推進する。

これまで報告されているオートファジーに関わる菌体成分認識分子としては、赤痢菌を用いた解析から Nod like receptors (NLRs) の 1 つである Nod2、また菌体表層に結合するユビキチンと、このユビキチンと LC3(オートファゴソームの膜成分で、Atg8 のホモログ)とを結合するアダプター分子である p62/NDP52 など、多数の報告がある。特に Nod 2 については、Inflammatory Bowel Disease (IBD) との関連から、Nod2 の異常により細胞内での菌体の排除が機能しないことでオートファジーが異常となることが報告されている (Tachil et al. *Gastroenterology*. 2012)。しかし、申請者らの予備的な解析結果においては、A 群レンサ球菌感染では Nod2 は全く関係せず、また、ユビキチンについても「菌体を認識」するのではなく、「菌を包んだオートファゴソーム膜」が認識されているため、これまで仮定されているモデルは全く

当てはまらない。すなわち、既存の情報だけでは、本提案の解析は不可能である。また、A 群レンサ球菌の「細胞内には侵入するが、細胞内でオートファジーに認識されない」変異株を用いた解析結果から、A 群レンサ球菌によって誘導されるオートファジーには、菌体の細胞質への露出が必須であることも明らかとしている。そのため、細胞質で菌体を認識すると予測されるパターン認識分子 (Toll like receptors; TLRs および NLRs) をターゲットとして、Atg5 依存性の選択性オートファジーあるいは Atg5 非依存性の代替性オートファジーの分子メカニズムを明らかとする。また、申請者らは、これまでオートファジーの機能を多角的に捉え、A 群レンサ球菌のオートファジーには、細胞内の小胞輸送に重要である Rab タンパクのうち、Rab9 や Rab23 が必須であることを明らかとしている。さらに、炎症反応については、申請者らは、すでに細胞内での NLRs の 1 種である NRLX1 が細胞内での ROS 産生を制御すると同時にオートファジーの誘導を制御することで、オートファジーの誘導と細胞死・炎症反応を制御している可能性があることを報告している。そのため、オートファジーによる菌体の排除と炎症反応のスイッチングに関しても、本課題で明らかにする。

4. 研究成果

(1) オートファゴソーム形成に関わる Rab タンパク質群のスクリーニング

現在 60 種類あるヒトの Rab タンパク質のほぼ全ての発現系を構築し、A 群レンサ球菌の感染によって誘導されるオートファジーに関わる Rab タンパク質を網羅的に解析した。飢餓誘導で誘導されるオートファゴソームの形成とは大きく異なり、通常でいはい使用されることのない Rab タンパク質群が動員されていることが明らかとなった。また、このオートファゴソーム形成に必須である Atg タンパク質のうちではこれまで KO 細胞由来の M E F 細胞が使われてきたが、ゲノム編集法により培養系細胞 b では Atg5, 7 といったオートファゴソーム形成に必須なタンパク質群の KO 細胞株の作成に成功した。

(2) 細胞内の菌体認識レセプターの 1 種である NRLX1 の関与

細胞内にある種々の菌体成分を認識するレセプターである NRLX1 に着目し、その相互作用の解析を行ったところ、NRLX1 と相互作用を行う因子の 1 つで炎症反応の誘導制御に関わっていることを明らかとすることができた。

(3) Rab17 によるオートファゴソーム形成の制御

細胞内小器官の融合に必須である Rab17 の機能に着目して解析を行った。Rab17 はリサイクリングエンドソームに局在することが知られていたが、この Rab17 が、細菌感染特異

的に誘導されるオートファゴソームが巨大化するための膜の供給に機能していることを明らかとした。

(4) Rab30 によるオートファゴソーム形成の制御

Rab30 は、通常の細胞ではゴルジ体の形態形成に重要な役割を果たしているが、Rab30 のノックダウン細胞では、A 群レンサ球菌を包み込むオートファゴソームの形成が抑制され、また細胞質内の菌の分解も抑制されていた。Rab30 は飢餓誘導で誘導されるオートファゴソームにも局在は認められたものの、飢餓誘導でのオートファゴソーム形成そのものには関与していなかった。これらの結果から Rab30 は、A 群レンサ球菌によるオートファゴソーム形成とゴルジ体の形態保持という2つの異なった機能を示すことが明らかとなった。

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16件)以下、代表論文
Nakagawa, I. Streptococcus pyogenes escapes from Autophagy. Cell Host Microbes. 14:604-606, 2013. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.chom.2013.11.012

Ito, C, Saito, Y, Nozawa, T., et al. Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. Mol. Cell. 52, 794-804. 2013 (査読有り)
DOI: 10.1016/j.molcel.2013.10.024

Haobam, B., Nozawa, T., et al. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cell Microbiol. 16: 1806-1821, 2014 (査読有り)
DOI: 10.1111/cmi.12329

S. Oda, Nozawa, T., et al. Golgi-resident GTPase Rab30 promotes the biogenesis of pathogen containing autophagosome. PLoS One. 11 e0147061, 2016 (査読あり)
DOI: 10.1371/journal.pone.0147061

[学会発表](計39件)以下、代表発表
中島慎太郎, 今村拓朗, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 細菌感染特異的オートファジーを制御する細胞制御因子の同定と機能解析
第87回日本細菌学会総会(2014年3月26-28日, 東京)
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, 東京)

Bijiya 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, 東京)

野澤敦子, 野澤孝志, 相川知宏, 中川一路
Rab35 regulates teh ubiquitin binding adaptor protein NDP52 in selective autophagy.
第88回日本細菌学会総会(2015年3月26-28日, 岐阜)

野澤孝志, 野澤敦子, 相川知宏, 中川一路
Rab17-mediated recycling endosomes contribute to antibacterial autophagosome formation.
第88回日本細菌学会総会(2015年3月26-28日, 岐阜)

中島慎太郎, 野澤孝志, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路
細菌感染特異的オートファジーにおけるアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-xL の機能解析
第89回日本細菌学会総会(2015年3月23-25日, 大阪)

野澤孝志, 野澤敦子, 中川一路
A disrupted PI4P-entiched TGN induced by Group A Streptococcus contributes to xenophagy
第89回日本細菌学会総会(2015年3月23-25日, 大阪)

[図書](計2件)
Nozawa, T, I. Nakagawa
Rab proteins in Autophagy: Streptococcus model (in Autophagy, Infection, and the immune response) 2015, Wiley

Maruyama F, Watanabe T, Nakagawa I. Stpreotoccus pyogenes, Basics Biology to Clinical Manidfestication 2015, ASM

[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）

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.bac.med.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川一路 (NAKAGAWA ICHIRO)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70294113

(2) 研究分担者

丸山史人 (Maruyama Fumito)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30423122

(3) 連携研究者

野澤孝志 (NOZAWA TAKASHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10598858