

令和元年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05188

研究課題名(和文) A群レンサ球菌特異的糖鎖を認識するオートファジー誘導機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of xenophagy against Group A Streptococcus

研究代表者

中川 一路 (NAKAGAWA, ICHIRO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70294113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、リソソームで細胞内分子や損傷を受けた細胞小器官、細胞内に侵入した病原体を標的として、リソソームでの分解を行う。我々は、NDP52を含むユビキチン化のターゲットに結合することでオートファジーを促進するオートファジー受容体を同定した。活性型GTP結合型のRab35は細菌を含むエンドソームに蓄積し、Rab35はNDP52を侵入した細菌に結合してリクルートすることを明らかとした。すなわちRab35-GTPがオートファジー受容体NDP52をリクルートすることによってオートファジーの重要な調節因子であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染によるオートファジーの誘導機構については、これまでに様々な菌を対象として多種多様な説が提唱されているが、「どのように菌を見分けて、オートファジーを誘導しているのか」という点については明らかとされていない。本研究の結果はオートファゴソーム形成の初期プロセスである隔離膜形成の誘導に必須な細菌菌体に存在する糖鎖を認識するユビキチンシステムを同定することで、新たな自然免疫系の一端を明らかとするという新規の展開が期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Autophagy targets intracellular molecules, damaged organelles, and invading pathogens for degradation in lysosomes. Recent studies have identified autophagy receptors that facilitate this process by binding to ubiquitinated targets, including NDP52. Here, we demonstrate that the small guanosine triphosphatase Rab35 directs NDP52 to the corresponding targets of multiple forms of autophagy. The active GTP-bound form of Rab35 accumulates on bacteria-containing endosomes, and Rab35 directly binds and recruits NDP52 to internalized bacteria. Additionally, Rab35 promotes interaction of NDP52 with ubiquitin. This process is inhibited by TBC1D10A, a GAP protein that inactivates Rab35, but stimulated by autophagic activation via TBK1 kinase, which associates with NDP52. Rab35, TBC1D10A and TBK1 regulate NDP52 recruitment to damaged mitochondria and to autophagosomes to promote mitophagy and maturation of autophagosomes, respectively.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 オートファジー Rab35 TDC1D10A ゼノファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌の生体組織への定着に対して、生体を広く覆う上皮や粘膜といった組織は病原性菌の侵入を感知する最前線のシステムであると同時に最大の防御システムである。しかしながら、一部の病原性細菌は、これら粘膜・上皮組織を突破し、宿主細胞内へ侵入する。申請者らは、非貪食系の細胞内の A 群レンサ球菌が、オートファジーによって効率的に分解されることを明らかとした (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、細菌感染に対するオートファジーが従来型とは異なる選択性オートファジー (selective autophagy) として機能していることが明らかとなってきた。

宿主と細菌の相互作用については、細菌表層に存在する定着因子と呼ばれる種々の構造物と宿主表層の構造物によって、宿主域や、感染する臓器が規定されている。しかし、これまでの研究は、菌体表層のタンパク質と宿主因子との相互作用についての解析がほとんどであり、細菌の菌体表層の多糖体との相互作用についての解析はほとんどなされていない。菌体表層に分泌される莢膜多糖体については、これまでに抗貪食作用などが報告されているが、菌体表層に存在する多糖体構造物については、これまでほとんど解析されていないのが実情である。

### 2. 研究の目的

宿主細胞内に侵入した菌は、細胞質に逃げる菌は選択性オートファジーによって認識される。この過程では、細菌が p62/NDP52 などのアダプター分子を介してユビキチンと結合することで、オートファジーによって分解されているとされている (図 1)。ところが、この菌体の排除に関わるオートファジーでは、菌の種類によって誘導されるオートファジーの様相が著しく異なることから、細胞内に、各菌を特異的に認識する機構が存在することが予測される。さらに、オートファジーの実行分子とユビキチンを繋ぐアダプター分子を欠損させた細胞であっても効率は低下するものの、オートファジーそのものは誘導され、菌体は分解される。これは、菌体表層にユビキチンに特異的に認識される分子が存在することを意味している。申請者は、菌種特異的にオートファジー誘導を引き起こす因子を同定しようとオートファジーが明確に誘導される A 群レンサ球菌をモデルとして解析を行ってきた (Science, 2004)。その結果、①LPXTG モチーフを持つ細胞壁にアンカリングするタンパク質や、これまでに報告されている表層タンパク質、情報学的に予測される菌体表層タンパク質の欠損体について網羅的に解析を行っても、細胞質内に侵入する菌についてはユビキチン化が誘導される。②オートファジー誘導のキーとなる Atg5 欠損細胞であっても細胞質の菌はユビキチン化される (図 1)。菌体表層の多糖抗原の遺伝子変異体で、オートファジーの誘導が著しく阻害されることを見いだした。また、宿主細胞内においては、N 型糖鎖を認識してユビキチン化を行う E3 SCF<sup>Fbs1</sup> が見いだされているが、生体内にはさらに別の E3 酵素の存在も示唆されており、これらを踏まえると菌体表層の糖鎖とくに多糖抗原を認識してユビキチン化を誘導する新規のシステムが存在すると考えられる。また、A 群レンサ球菌の表層の多糖抗原の合成酵素である *gacl* を欠損させた菌株では、group A carbohydrate の側鎖である  $\beta$ -GlcNac の付加がなくなるが、この 1 つの糖鎖欠損のみで、本菌の好中球による認識が著しく阻害されること (van Sorge et al, Cell Host Microbe., 2014) が報告されている。このような細菌表層に存在する多糖体の解析結果から、新たなユビキチン認識を介したオートファジー誘導系を見出すことができるのではないかと、という着想に至った。

### 3. 研究の方法

本研究では、菌体成分、とくに糖鎖成分を認識してオートファゴソーム形成を誘導する新規ユビキチンシステムを解明することを目的とし、下記の項目について研究を行う。(1) 種々の菌体表層の糖鎖変異体を作成し、宿主細胞内でのユビキチン結合能とオートファゴソーム形成についての解析を行う。すでに、A 群レンサ球菌感染細胞のオートファゴソーム形成のメンブレントラフィックに関わる Rab タンパク質のネットワークについての解析を行っており、通常の飢餓栄養時に誘導されるオートファジーの形成には関与しない様々な Rab タンパク質が細菌感染時に誘導されるオートファゴソーム形成の各ステップでは関与することを報告している。そのため、各ステージでの各変異体のユビキチン化によるオートファゴソーム形成初期の段階的に詳細に検討することが可能である。(2)(1) で得られた糖鎖変異体と野生型菌株を用いて菌体表層のユビキチン重合に関わる部位の同定と菌体の

糖鎖変異部位の同定を行う。(3)細菌菌体糖鎖を認識する新規ユビキチン修飾システムの同定を試みる。これにより細菌感染によって誘導されるオートファジーの初期段階、すなわち新規ユビキチン修飾システムを明らかとすることで、細菌感染特異的なオートファジーの誘導・制御に関わる制御系を特定する。

#### 4. 研究成果

(1)TBC1D10A はゼノファジーを抑制する。

A 群レンサ球菌(GAS)感染時の選択的オートファジーを調節する TBC / RabGAP を包括的にスクリーニングするために、まず HeLa 細胞を用いて EmGFP 融合 TBC / RabGAP およびオートファゴソーム膜のマーカーである mCherry タグ付き LC3 を過剰発現させ、これらの細胞に GAS を感染させた。感染 4 時間後の GAS に対するオートファゴソーム形成の効率を解析した。解析した 30 個の TBC/RabGAP のうち、TBC1D10A、10B、18、23、25、および RN-Tre の過剰発現は、オートファゴソーム形成を有意に抑制した。TBC1D10A の GAP 活性がオートファゴソーム形成を阻害するのに必要であるかどうかを調べるために、我々は、GAP 活性に必要な保存アルギニンがリジン (R160K) で置換さ

れた TBC1D10A 変異体、または TBC ドメインの保存グルタミン酸がアラニン (D157A) を作成した。野生型 TBC1D10A は、感染後 2 時間および 4 時間でオートファゴソーム形成を減少させたが R160K および D157A 変異体ではそのような変化はなく、GAP 活性が GAS 感染中のオートファゴソーム形成を阻害するために不可欠であることを示した。つぎに TBC1D10A と GAS の侵襲性効率の関係ならびに感染から 6 時間後の生存率を調べた。TBC1D10A および R160K 変異体の過剰発現は侵襲効率に影響を及ぼさなかったが、生存は対照細胞および R160K を過剰発現した細胞よりも TBC1D10A を過剰発現した細胞において約 1.5 倍高かった。すなわち TBC1D10A における GAP 活性がオートファゴソーム形成およびその後の GAS の分解を阻害するために必要であることを示している。

(2)TBC1D10A は侵入した細菌への NDP52 のリクルートを阻害する。

GAS はエンドサイトーシスを介して宿主上皮細胞に侵入する。損傷したエンドソーム膜はサイトゾルガレクチン 8 によって認識され、サイトゾルにさらされた細菌はユビキチンでコーティングされ、オートファジー受容体を介してオートファゴソームにターゲティングされる。TBC1D10A がオートファゴソーム形成を抑制するためにこれらの経路を阻害するかどうかを決定するために、TBC1D10A を過剰発現する細胞におけるオートファジーマーカーのリクルートを調べた。GAS がガレクチン 8、ユビキチン、p62、または OPTN で被覆されている細胞の数は変化せず、TBC1D10A がエンドソームから細胞質への GAS の逃避に影響を及ぼさなかった。しかしながら、NDP52 で被覆された細菌を有する細胞の頻度は、TBC1D10A を過剰発現する細胞では有意に減少したが、R160K および D157K 変異体を過剰発現する細胞では減少しなかった。これらの知見は、TBC1D10A GAP 活性が NDP52 の GAS

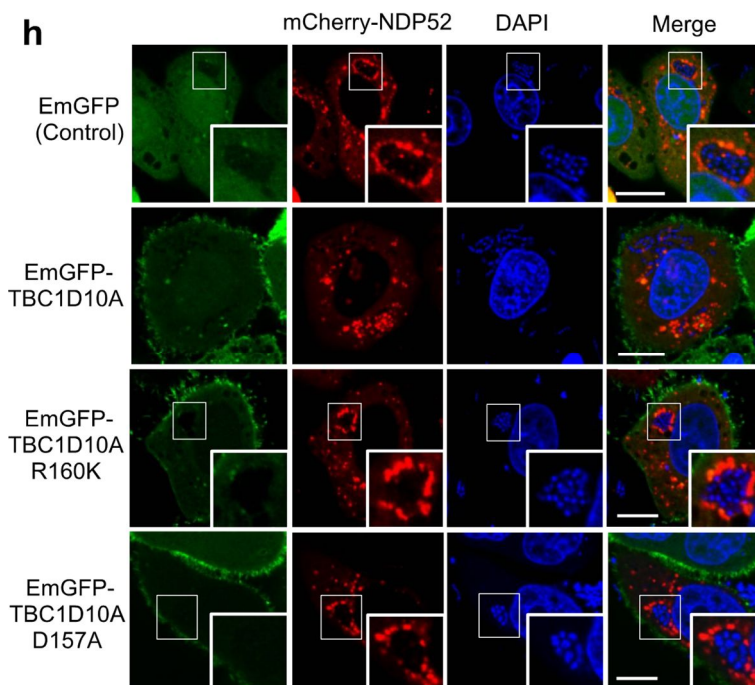


図 1 A 群レンサ球菌感染細胞で特異的に局在する RabGAP TDC1D10A とその変異体。野生型の TDC1D10A 発現細胞ではアダプター分子である NDP52 の局在は認められないが、変異体では NDP52 が局在ようになる。

へのリクルートを阻害することを示している。

(3) Rab35 は、ゼノファジーおよび NDP52 の細菌へのリクルートを調節する

Rab27A および Rab35 に対する TBC1D10A の G A P 活性は、それぞれメラノソーム輸送およびエキソソーム分泌を調節することが知られている。したがって、我々は Rab27A および Rab35 ノックアウト細胞株を作製し、これらのノックアウト細胞における NDP52 リクルートおよびオートファゴソーム形成を調べた。Rab27A ではなく、Rab35 のノックアウトは、侵入する細菌にตอบสนองして NDP52 リクルートおよびオートファゴソーム形成を有意に抑制した。これらの結果をさらに確認するために、Rab35 が miR-RNAi ノックダウンによって枯渇した HeLa 細胞において、NDP52 リクルートおよびオートファゴソーム形成を調べた。Rab35 ノックアウトについての結果と一致して、これらの細胞において同様の阻害効果が得られた。対照的に、Rab35 ノックアウトは、ガレクチン 8、ユビキチン、p62、および OPTN のリクルートを減少させなかった。これらの結果は、TBC1D10A による GAS およびオートファゴソーム形成に対する NDP52 リクルートの阻害効果が Rab35 によって特異的に媒介されることを示唆している。

次に、NDP52、Rab35、およびオートファジー欠損 ATG5 ノックアウト細胞における殺菌活性を調べた。予想通り、GAS の細胞内侵入は野生型細胞とノックアウト細胞の間で同程度であったが、後者の生存率は有意に高かった。生存している GAS 細胞の数は、NDP52 および Rab35 ノックアウト細胞よりも ATG5 ノックアウト細胞の方が多かった。まとめると、結果は、Rab35 が NDP52 媒介オートファゴソーム形成および殺菌活性に必要であることを示している。NDP52 および Rab35 は、TBK1 を活性化し、そして p-TBK1 S172 を細菌にリクルートするのに必要とされる。OPTN および NDP52 は、マイトファジーの間に TBK1 を活性化するのに必要とされる。次に、TBK1 は、ユビキチン鎖および LC3 との結合をそれぞれ促進するために、p62 中の S403 および OPTN 中の S177 をリン酸化する。したがって、TBK1 中の S172 のリン酸化によって測定されるように、GAS に感染した NDP52 および Rab35 ノックアウト細胞における TBK1 活性化を調べたところリン酸化 TBK1 は、野生型細胞よりもノックアウト細胞において有意に低かった。これらの結果は、NDP52 および Rab35 が TBK1 を活性化しそして侵入細菌に p-TBK1 S172 をリクルートするのに必要とされることを示唆している。

(4) 活性化 Rab35 は、Zn フィンガードメインを介して NDP52 と直接相互作用する

免疫蛍光分析は、野生型または ATG5 ノックアウト HeLa 細胞において、内因性 Rab35 が GAS にリクルートされた内因性 NDP52 と共局在していることを示す。これらの結果は、Rab35 がオートファジーとは無関係に NDP52 と共局在することを示している。Rab35 と NDP52 との間の相互作用を支持して、Rab35 に対する抗体が未感染細胞と感染細胞の両方の溶解物から内因性 NDP52 を共沈させることを見出した。NDP52 とユビキチンとの相互作用が、NDP52 と Rab35 との相互作用に必要であるかどうかを決定するために、NDP52 D439K 変異体と Rab35 との間の相互作用を調べた。免疫沈降により、EmGFP-NDP52 D439K 変異体が FLAG-Rab35 と相互作用することが実証され、NDP52-ユビキチン結合は NDP52-Rab35 結合に必須ではないことが示唆された。PLA を用いて Rab35-NDP52 相互作用をさらに検証した。PLA シグナルは、非感染細胞の細胞質中に散乱し、基底レベルで Rab35 と NDP52 との間に相互作用が観察されることを示唆している。一方、感染中、明瞭な PLA シグナルが GAS を取り囲んでいた。これらの観察結果は、感染中に Rab35 と NDP52 との間の相互作用が GAS を含む小胞周辺に蓄積することを示している。

(5) Rab35 依存性オートファジーは NDP52 を低下させる

p62 および NBR1 のようなオートファジー受容体はカーゴと共に分解されるので、オートファジー中に NDP52 が同様に分解されるかどうかを試験するために、野生型 HeLa および ATG5 ノックアウト細胞を発現させた。二重 EmGFP-mCherry タグを有する NDP52 を発現させたそれぞれの細胞に 4 時間 GAS に感染させた。mCherry は酸性で蛍光性を維持しながら EmGFP は酸性リソソーム中で急速に消光されるので、酸性リソソームへの NDP52 の進入は EmGFP シグナルの選択的減少によりモニターすることができる。細菌を囲む EmGFP 蛍光は、野生型細胞の約 60% において部分的に失われた。一方、EmGFP はノックアウト細胞において蛍光を失うことなく検出された。さらに、GAS 感染は、野生型細胞において内因性 NDP52 および p62 の経時的分解を誘発した。興味深いことに、ATG5、NDP52、およ

び Rab35 がノックアウトされた細胞では分解が損なわれていました (図 4C、D および E)。さらに、NDP52 および p62 の発現は、野生型細胞よりも ATG5 ノックアウト細胞において有意に高かった。まとめると、これらのデータは、NDP52 が Rab35 依存的にオートファジーによって分解されることを強く示唆している。

(6) Rab35 は飢餓誘発および基礎的自食作用において NDP52 を介した自食作用の成熟を調節する

NDP52 は、基礎条件下でミオシン VI、TRAF6 結合タンパク質、および OPTN を含む複合体を介してオートファゴソーム成熟を促進すると報告されている。NDP52 と相互作用する TBK1 は、Mycobacterium tuberculosis var. と同様に、飢餓誘発オートファジー中のオートファゴソーム成熟に必要である。したがって、我々は Rab35 が NDP52 を空間的に調節することによって飢餓誘発性および基礎的自食作用に関与している可能性があるかと推測した。NDP52 は、基礎および飢餓誘導オートファゴソームにおいて検出された。Zn フィンガードメインは、NDP52 をオートファゴソームに標的化するのに不要であり、一方、コイルドコイルドメインは必要であった。GFP-LC3 を安定的に発現する野生型 HeLa 細胞では、栄養欠乏に反応して蛍光点が増加した。NDP52 および Rab35 ノックアウト細胞において、蛍光は基礎条件下でも増加した。さらに、NDP52 および Rab35 のノックアウトは、基礎条件下での LC3-II の存在量を増加させた。オこれらの結果は、食作用低下が NDP52 または Rab35 ノックアウト細胞において損なわれていることを示唆している。

(7) TBK1 は、NDP52 と Rab35 との相互作用を促進する

オートファジー中の Rab35 を介した NDP52 のリクルートの機序を調べるために、GAS 感染中の Rab35 の細胞内局在を決定した。内因性 Rab35 は、侵入病原体によって損傷を受けたエンドソームのマーカーである内因性ガレクチン 3 と共局在した。野生型 Rab35 および GTP ロック Q67A 変異体は GAS にリクルートされたが、GDP 型 S22N 変異体はされなかったことから、このプロセスは Rab35 の GTP 結合型に依存する。これらの結果は、ガレクチンリクルートの前に、Rab35 が細菌含有エンドソーム上に GTP 依存的に局在することを示唆している。以上の知見から、TBK1 が、NDP52 と Rab35 との相互作用を促進することによってオートファジー標的への NDP52 のリクルートに関与していることを示している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件) うち代表論文

1. Hirayasu, K Sato, F., Suenaga, T., Shida, K., Arase, N., Oikawa, K., Yamaoka, T., Murota, H., Chibana, H., Nakagawa, I., Kubori, T., Nagai, H., Nakamura, Y., Katayama, I., Collonna, M., Arase, H. "Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2". *Nature Microbiol.* 1. 16054, 2016.
2. T. Nozawa, A. Minowa-Nozawa, C. Aikawa, I. Nakagawa. "The STX6-VTI1B-VAMP3 complex facilitates xenophagy by regulating the fusion between recycling endosomes and autophagosomes". *Autophagy*, 13:57-69, 2017.
3. Nakajima S, Aikawa C, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Toh H, Nakagawa I. "Bcl-xL Affects Group A *Streptococcus*-Induced Autophagy Directly, by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes, and Indirectly, by Inhibiting Bacterial Internalization via Interaction with Beclin 1-UVRAG". *PLoS One.* 2017 Jan 13;12(1):e0170138. doi: 10.1371/journal.pone.0170138. eCollection 2017
4. Atsuko Minowa-Nozawa, Takashi Nozawa, Keiko Okamoto-Furuta, Haruyasu Kohda, Ichiro Nakagawa. Rab35 GTPase recruits NDP52 to autophagy targets. *EMBO J.* (2017) 36, 2790-2807.
5. Nozawa, T., Aikawa, C., Minowa-Nozawa, A., Nakagawa, I. The intracellular microbial sensor NLRP4 directs Rho-actin signaling to facilitate Group A *Streptococcus*-containing autophagosome-like vacuole formation. *Autophagy.* 13(11):1841-1854. 2017. 10.1080/15548627.2017.1358343
6. Koji Nakajima, Takashi Nozawa, Atsuko Minowa-Nozawa, Hirotaka Toh, Shunsuke Yamada, Chihiro Aikawa, Ichiro Nakagawa. RAB30 regulates phosphatidylinositol 4-kinase beta-dependent autophagy against Group A *Streptococcus*. *Autophagy*, doi: 10.1080/15548627.2018.1532260, 2018.
7. Ching-Yu Lin, Takashi Nozawa, Atsuko Minowa-Nozawa, Hirotaka Toh, Ichiro Nakagawa. LAMTOR2/p14 is required for the TAX1BP1-mediated xenophagy. *Cell. Microbiol.* Doi:

- 10.1111/cmi.12981. 2018.
8. Kenta Funahashi, Takahiko Shiba, Takayasu Watanabe, Keiko Muramoto, Yasuo Takeuchi, Takuya Ogawa, Yuichi Izumi, Tsutomu Sekizaki, Ichiro Nakagawa, Keiji Moriyama. Functional dysbiosis within dental plaque microbiota in cleft lip and/or palate patient. Eur. J. Orth. In press 2018.

〔学会発表〕(計 31 件) うち代表発表

1. 中川一路 細菌感染とオートファジー 第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月、仙台
2. 藤 博貴, 相川 知宏, 中島 慎太郎, 野澤 孝志, 野澤 敦子, 中川 一路 Streptococcus pyogenes NADglycohydrolase as negative regulator for internalization into HeLa cells 第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月、仙台
3. 中島 慎太郎, 相川 知宏, 野澤 孝志, 野澤 敦子, 藤 博貴, 中川 一路 Bcl-xL regulates Group A Streptococcus internalization to host cell and autophagosome-lysosome fusion 第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月、仙台
4. Ching-Yu Lin, 野澤孝志, 中川一路 p14 is required for the TAX1BP1-mediated xenophagy against Group A Streptococcus 第 49 回レンサ球菌研究会、2017 年、新潟
5. 古田紀之、野澤孝志、中川一路 A 群レンサ球菌における菌体表層糖鎖は選択的オートファジーの標的となる 第 70 回日本細菌学会関西支部会、2017 年、大阪
6. 野澤 孝志, 相川 知宏, 野澤 敦子, 中川 一路 細胞内病原体センサー NLRP4 は Rho-アクチン制御を介して A 群レンサ球菌に対するオートファジーを誘導する 第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 福岡
7. 藤 博貴, 相川 知宏, 中島 慎太郎, 野澤 孝志, 野澤 敦子, 中川 一路 Analysis of Group A Streptococcus NAD-glycohydrolase as a regulator for uptake into HeLa cells 第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 福岡
8. 相川 知宏, 中島 慎太郎, 野澤 孝志, 野澤 敦子, 藤 博貴, 中川 一路 NLRX1 inhibits the Group A Streptococcus invasion into host epithelial cells 第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

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

相川知宏 (AIKAWA CHIHIRO )  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号： 70725499

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。