

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08775

研究課題名(和文) Beclin1複合体形成と細菌感染特異的オートファジーにおけるBcl-xLの役割

研究課題名(英文) The role of Bcl-xL in the formation of the Beclin 1 complex and induction of autophagy during bacterial infection

研究代表者

相川 知宏 (Aikawa, Chihiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70725499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Beclin 1はUVRAG等と複合体形成し、栄養飢餓時のオートファジー誘導を制御する。さらにBcl-2ファミリータンパク質や一部のNod like receptor (NLR)が複合体に結合することで、複合体の機能を正あるいは負に制御する。しかし、細菌感染時に誘導されるオートファジー制御においてBeclin 1とその相互作用分子の役割は不明である。本研究では、Bcl-xLとNLRX1(NLRの1つ)がBeclin 1-UVRAG複合体と相互作用することで、A群レンサ球菌の細胞侵入ならびにオートファジーの誘導、特にオートファゴソームとリソソームの融合を制御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

本研究から、Beclin 1によるオートファジー制御機構は、栄養飢餓時と細菌感染時でマシーナリーの一部に違いがあることが明らかになった。特に、細菌感染時には、Beclin 1自体はオートファゴソーム形成には関与せず、Bcl-xLやNLRX1といった分子との相互作用により細胞へと侵入する細菌数を制御することで、結果として形成されるオートファゴソームの数が増減することが明らかになった。この発見は細胞のもつオートファジーという細菌感染防御システムを深く理解する上で重要であると同時に、新たな感染治療法を構築する上でも、Beclin 1とその相互作用分子が優れた標的(対象)となることを示している。

研究成果の概要(英文)：Anti-apoptotic Bcl-2 family proteins are known to inhibit starvation-induced autophagy by directional interaction with Beclin 1, but how the interaction regulates anti-bacterial autophagy is still unclear. We found that Bcl-xL regulates Group A Streptococcus (GAS)-induced autophagy. Our data demonstrate that Bcl-xL but not Bcl-2 inhibits GAS-induced autophagy directly by suppressing autophagosome-lysosome fusion and indirectly by suppressing GAS internalization via interaction with Beclin 1-UVRAG.

We also demonstrate that NLRX1 functions as a negative regulator to inactivate the Beclin-UVRAG complex. GAS invasion was markedly increased in NLRX1 knockout cells, leading to the potentiation of autophagosome and autolysosome formation. This is induced by the interaction of NLRX1 with Beclin 1 and UVRAG. Furthermore, NLRX1 interacted with Beclin 1 via its NACHT domain and this interaction was responsible for the NLRX1-mediated inhibition of invasion and autophagic processes.

研究分野：細菌学

キーワード：オートファジー Group A Streptococcus Beclin 1 Bcl-xL NLRX1

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

1. 研究開始当初の背景

生体は上皮組織による物理的障壁や免疫系など、様々な手段で病原微生物の感染に対して感染制御を行っている。しかし、病原性細菌の中には、これらの防御機構を突破して宿主細胞内にまで侵入できるものが存在し、生体側はこれらの細菌に対して対抗手段をほとんど持ち合わせていないと考えられていた。2004年、当該研究室を主宰する中川らが、これまで栄養飢餓時に細胞内のオルガネラやタンパク質を分解し、栄養源の供給を行う生理的なシステムとして知られていたオートファジー（自食作用）が、上皮細胞内に侵入したA群レンサ球菌（Group A *Streptococcus*, GAS）に対する分解・除去機構として機能していることを明らかにした（Nakagawa I, et al. *Science*. 2004）。この発見をきっかけとし、現在までに様々な細胞侵入性細菌とオートファジーとの関わりが報告されている（Gutierrez MG, et al. *Cell*. 2004, Ogawa M, et al. *Science*. 2005）。オートファジーが誘導されると、分解の対象物が隔離膜と呼ばれる膜区画に包まれる。次に、隔離膜の末端同士が融合することで二重膜構造のオートファゴソームが形成される最後にオートファゴソームはリソソームと融合することでオートリソソームとなり、対象物を分解する。オートファゴソームにはリン脂質の1つであるフォスファチジルイノシトール3リン酸（PI3P）が含まれ、PI3Pは型PI3キナーゼ（PI3K）という酵素（Vps34）により産生される。Vps34はBeclin 1（Atg6の哺乳類ホモログ）やAtg14と複合体を形成することで、オートファジーの誘導を制御する（Itakura E, et al. *Mol. Biol. Cell*. 2008）。このとき、細胞死制御を担うBcl-2ファミリータンパク質であるBcl-2あるいはBcl-xLは、BH3ドメインを介してBeclin 1と結合することでBeclin1-Vps34複合体形成を阻害する（Pattingre S, et al. *Cell*. 2005）。また、Beclin 1はUVRAGを介してAtg14やRubiconと複合体を形成することが知られ、Atg14との複合体形成によってはオートファゴソーム形成やエンドサイトーシス経路が促進される一方、Rubiconとの複合体形成においてはエンドサイトーシス経路やオートリソソーム形成が抑制される（Hayashi-Nishino M, et al. *Nat Cell Biol*. 2009）。また、病原微生物に対する細胞内レセプターとして知られるNOD-like receptor（NLR）の1つであるNLRP4は、Beclin 1と相互作用することでGAS感染時のオートファジーの誘導を制御する（Jounai N, et al. *J Immunol*. 2011）。

これまで行った予備試験から、Bcl-2あるいはBcl-xLの強発現細胞において、GAS感染時のオートファジー誘導能を評価したところ、Bcl-xL強発現細胞ではオートファゴソーム形成率の低下が認められた。一方で、Bcl-2強発現細胞では、オートファゴソーム形成率の低下は認められなかった。また、Bcl-xL強発現細胞ではGASの細胞内侵入率の増加が認められた。また、NLRの1つであるNLRX1の強発現細胞ではオートファゴソーム形成率の低下が観察され、さらにNLRX1-Beclin 1の相互作用がオートファゴソームの形成に重要であることが明らかになった。このことから、GAS感染時にはBcl-2ではなくBcl-xLがエンドサイトーシスを介したGASの細胞侵入とオートファジーの制御に関わること、細胞内レセプターであるNLRX1もまた、GAS感染時のオートファジーの制御に関わることを示唆された。しかしながら、Bcl-xLおよびNLRX1、両分子による細菌の細胞侵入およびオートファジー制御機構の詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、Bcl-xLならびにNLRX1強発現細胞内で観察された、オートファゴソーム形成の変化に着目し、2つの分子の細菌感染特異的オートファジーの誘導・制御における生理的な役割と重要性を明らかにすることを目的とする。いずれの場合も、相互作用の重要なパートナーであるBeclin 1とその複合体構成分子の種類や活性の違いに焦点を当て、生化学的あるいは細胞生物学的手法によって解析を行う。

3. 研究の方法

(1) Bcl-xL、NLRX1 および Beclin 1 複合体構成分子（Beclin 1、UVRAG、Rubicon）の欠損細胞の作成

CRISPR/Cas9 システムを用いて、Bcl-xL、NLRX1 および Beclin 1 複合体構成分子の欠損細胞を作成した。しかし、Beclin 1 複合体構成分子のうち Atg14 および Vps34 については欠損細胞を作成することができず、遺伝子発現のノックダウン細胞を作成し試験に使用した。

(2) 細胞侵入能試験

GASの細胞内侵入はゲンタマイシンプロテクションアッセイにより評価した。簡単に、 4×10^4 cells/well の細胞に MOI:100（1細胞に100細菌）でGASを感染させた。感染30分あるいは1時間後に細胞をPBSで1度洗浄し、100 µg/ml ゲンタマイシンを含む培地に交換し、細胞外の菌を殺菌した。感染30分あるいは1時間後に回収した細胞から得た細菌数に対して、感染2時間後に回収された細胞から得た細菌数の割合を細胞侵入率、4時間後に回収された細胞から得た細菌数の割合を細胞内生存率とした。

(3) Western blotting

SDS-PAGEにて分離したタンパク質をPVDF膜に転写後、ブロッキング溶液（5%スキムミルクを含むTris緩衝生理食塩水 [TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl]）で室温1時間ブロッキングした後、一次抗体を含んだブロッキング溶液において室温1時間反応させた。0.05% Tween 20を含むTBS (TBS-T) で洗浄後、二次抗体を含んだブロッキング溶液において室温1時間反応

させた。最後に TBS-T で洗浄後、発色・検出した。

(4) 免疫沈降法

FLAG 融合タンパク質と GFP 融合タンパク質を発現させた細胞を Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 0.5% NP40, protease inhibitor, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で懸濁した後、遠心して上清を回収した。ここに Lysis buffer で平衡化した Protein G Sepharose を加え、4 で 1 時間攪拌し、pre-clear した。次にこの上清に 1,000 倍希釈した抗 FLAG 抗体を加え、4 で 1 時間攪拌した。洗浄後 Protein G Sepharose を加え、4 で 2 時間攪拌した。Lysis buffer で 5 回以上洗浄し、等量の 2 x sample buffer を加え、100 5 分間加温処理した。SDS-PAGE にて展開後、Western blotting により抗 GFP 抗体で相互作用するタンパク質を検出した。

(5) 共焦点顕微鏡観察

感染細胞において、初期エンドソームの指標として EEA1、後期エンドソームの指標として Rab7 を用いた。損傷したエンドソームの指標としては Galectin-3 を用いた。オートファゴソームの指標には LC を、リソソームの指標には LAMP1 を用いた。

(6) オートファゴソームおよびオートリソソーム形成率の測定

共焦点顕微鏡を用いて、GAS の感染が観察された細胞のうち、GAS を取り囲んだ LC3 vacuole が認められた細胞の割合をオートファゴソーム形成率とした。また、リソソームと共局在するオートファゴソームをオートリソソームとし、共局在率をオートリソソーム形成率とした。

4. 研究成果

(1) GAS の細胞侵入およびオートファジー制御機構における Bcl-xL の役割

Bcl-xL は GAS の細胞侵入とオートリソソーム形成を抑制する

Bcl-xL 欠損細胞と野生型細胞において感染 1 時間後の GAS の細胞侵入能を比較した。この結果、野生型細胞への侵入率に比べ、Bcl-xL 欠損細胞への GAS の細胞侵入率は顕著に増加した。宿主細胞に付着した後、エンドソームに包まれて細胞内への侵入を果たした GAS は、SLO と呼ばれる溶血毒素によってエンドソーム膜を破り、細胞質へと移行する (Nakagawa I, et al. *Science*. 2004)。Galectin-3 は損傷した膜を認識し集積するため、Galectin-3 を指標として SLO によって傷害を受けたエンドソームを観察することが可能である。Bcl-xL 欠損細胞と野生型細胞間で Galectin-3 を指標として GAS を内包する傷害を受けたエンドソーム (あるいはエンドソームから細胞質へと移行しようとしている GAS そのもの) の数を評価したところ、感染 1 時間後に Bcl-xL 欠損細胞で観察された Galectin-3 陽性のエンドソーム (あるいは GAS) の数は野生型細胞のものとは比べ顕著に増加していた。また、Bcl-xL 欠損細胞でのオートファゴソーム形成率も野生型細胞と比べて 1.5 倍程度高い値を示した。一方で、Galectin-3 陽性のエンドソーム (あるいは GAS) のうち、オートファゴソーム膜のマーカーである LC3 にも陽性のエンドソームは、Bcl-xL 欠損細胞と野生型細胞間でその数に有意な差は認められなかった。さらに、オートリソソーム (リソソームと融合するオートファゴソーム) の形成率は感染 2-6 時間後において、Bcl-xL 欠損細胞で顕著に高かった。これらの結果を踏まえると、Bcl-xL は GAS の細胞侵入を抑制することで、結果としてオートファゴソームの形成を阻害する。しかしながら、エンドソームから細胞質への GAS の移行を阻害することはないため、オートファゴソーム形成機構には影響しない。一方で、オートファゴソームとリソソームの融合を抑制していることが示唆された。

Bcl-xL-Beclin 1-UVRAG が GAS の細胞侵入とオートファジーを制御する。

Bcl-2 や Bcl-xL は、自身の BH3 ドメインを介して Beclin 1 に結合し、エンドサイトーシス経路や飢餓時に誘導されるオートファジーの誘導を制御している (Pattingre S, et al. *Cell*. 2005)。Bcl-xL が GAS 感染時の細菌の細胞侵入やオートリソソーム形成を制御していることが示唆されたことから、次に Bcl-xL の相互作用のパートナーである Beclin 1 が両細胞応答の制御に関与しているかを検証した。Beclin 1 欠損細胞と野生型細胞で GAS の細胞侵入能を試験したところ、Beclin 1 欠損細胞では細胞侵入率が顕著に減少していた。Galectin-3 陽性のエンドソーム (あるいは GAS) 数、オートファゴソーム形成率ならびにオートリソソームの形成率は Beclin 1 欠損細胞で顕著に減少した。ただし、Galectin-3 陽性かつ LC3 陽性のエンドソーム (GAS) の数は Beclin 1 欠損細胞と野生型細胞間で差は認められなかった。これらの結果より、GAS の細胞侵入およびオートファゴソームとリソソームの融合には、Bcl-xL と、その相互作用パートナーである Beclin 1 が関与していることが示唆された。一方で、Atg5 や Atg7 といったオートファゴソーム形成に必須な分子の欠損細胞では GAS の細胞侵入に変化は認められず、Bcl-xL-Beclin 1 経路に Atg5 や Atg7 は関与していないことが示唆された。次に、Beclin 1 以外の複合体構成分子が Bcl-xL を介した細胞応答に関与しているかを検証した。Atg14 ノックダウン細胞においては GAS の細胞侵入能やオートファゴソームやオートリソソーム形成率に変化は認められなかった。一方で、Beclin 1 欠損細胞で観察された GAS 細胞侵入能の低下は、UVRAG を強発現させることで野生型細胞への侵入能と同程度までに回復した。つまり、Bcl-xL は Beclin 1 と共に複合体構成分子である UVRAG と協調することで、GAS の細胞侵入を制御していることが明らかになった。以上の研究成果は 2017 年に発行された PLoS One 誌に掲載された (Nakajima S and Aikawa C, et al. *PLoS One*. 2017)

(2) GAS の細胞侵入およびオートファジー制御機構における NLRX1 の役割

NLRX1 はエンドサイトーシスを介した GAS の細胞侵入を抑制する

NLR の 1 つである NLRX1 の GAS 感染細胞における機能を検証するため、NLRX1 欠損細胞を作成した。この細胞を用いて、GAS の細胞侵入能を試験した。野生型細胞と比較して、NLRX1 欠損細胞では GAS の細胞侵入率は顕著に増加した。実際、共焦点顕微鏡を用いた細胞の観察においても、野生型細胞と比べて NLRX1 欠損細胞内には感染の早い時間に多数の GAS 菌体が認められた。また、初期エンドソーム (EEA1 陽性 GAS) および後期エンドソーム (Rab7 陽性 GAS) の数も NLRX1 欠損細胞では顕著に増加した。以上より NLRX1 はエンドサイトーシスを介した GAS の細胞侵入を抑制していることが示唆された。

NLRX1 は GAS に対するオートファジーの誘導を抑制する

次に NLRX1 欠損細胞においてオートファゴソーム形成率を測定した。野生型細胞と比べて NLRX1 欠損細胞で観察されたオートファゴソーム形成率は感染の早い時間で顕著に増加した。また、NLRX1 欠損細胞ではオートリソソーム形成率の増加も認められた。しかしながら、GAS の細胞内生存率は野生型細胞と NLRX1 欠損細胞間で差は認められなかった。以上の結果を踏まえると、NLRX1 欠損細胞では細胞へと侵入する GAS の増加に伴いオートファゴソーム形成が促進される。一方でオートファゴソームとリソソーム融合も促進されるため、増加した細胞内の GAS が効率的に分解され、結果として細胞内の GAS 生存率に差が認められなかったと考えられる。

NLRX1-Beclin 1-UVRAG 複合体は GAS の細胞侵入を制御する

これまでに、NLR の 1 つである NLRP4 が Beclin 1 と結合し、オートファジーの誘導を抑制することが報告されている (Jounai N, et al. J Immunol. 2011)。そこでまず NLRX1 と Beclin 1 複合体構成分子が相互作用するかを検証した。免疫沈降法を用いて NLRX1 と共沈降してくる Beclin 1 複合体構成分子を調べたところ、Beclin 1、UVRAG、Atg14、Vps34、Rubicon が NLRX1 と共沈降し、相互作用していることが明らかになった。次に、これら NLRX1 と相互作用する Beclin 1 複合体構成分子の欠損細胞あるいはノックダウン細胞を作成し、これらの細胞で GAS の細胞侵入を試験した。その結果、Beclin 1 および UVRAG 欠損細胞において GAS の細胞侵入率が低下した。一方で、Atg14、Vps34 ノックダウン細胞および Rubicon 欠損細胞では GAS の細胞侵入率に変化は認められなかった。また、細胞侵入率の減少が見られた Beclin 1 と UVRAG 欠損細胞においては、初期エンドソーム (EEA1 陽性 GAS) および後期エンドソーム (Rab7 陽性 GAS) の数も野生型細胞と比べて減少していた。以上より、NLRX1 は Beclin 1 あるいは UVRAG と相互作用することで、エンドサイトーシスを介した GAS の細胞侵入を制御していることが示唆された。

NLRX1-Beclin 1-UVRAG 複合体は GAS 感染時のオートファジーの誘導を制御する

次に Beclin 1 と UVRAG 欠損細胞において Galectin-3 陽性のエンドソーム (あるいは GAS) の数をカウントし、野生型細胞と比較したところ、Beclin 1 欠損細胞では Galectin-3 陽性エンドソームの減少が認められた。一方で UVRAG 欠損細胞では Galectin-3 陽性エンドソームの数に変化は認められなかった。エンドソームから脱出した GAS は細胞質でユビキチン化され、このユビキチン化 GAS がアダプター分子を介してオートファゴソームに捕捉される。そこで

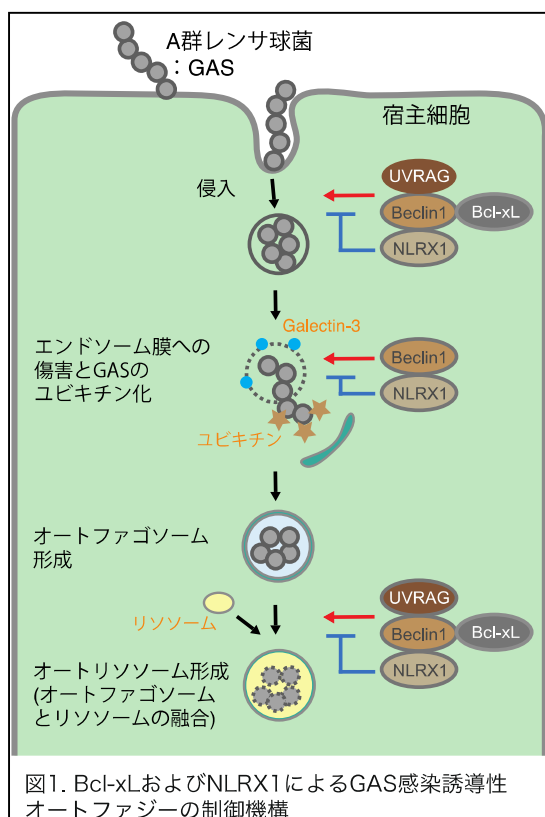


図1. Bcl-xLおよびNLRX1によるGAS感染誘導性オートファジーの制御機構

Beclin 1 および UVRAG の 2 つの欠損細胞においてユビキチン化 GAS を持つ細胞 (FK2 陽性細胞) の数をカウントしたところ、Beclin 1 欠損細胞においてのみ FK2 陽性細胞の数が減少した。つまり、Beclin 1 と UVRAG の両分子は NLRX1 との相互作用を介して GAS の細胞侵入を制御するものの、GAS のエンドソームから細胞質への移行およびユビキチン化には Beclin 1 のみが関与していることが明らかになった。次に、Beclin 1、UVRAG の 2 つの欠損細胞においてオートファゴソームおよびオートリソソームの形成率を測定した。その結果、野生型細胞と比較して、Beclin 1、欠損細胞でのみオートファゴソーム形成率が減少した。オートリソソーム形成率は Beclin 1、UVRAG 両欠損細胞での減少が認められた。Beclin 1 および UVRAG 欠損細胞では GAS の細胞侵入が抑制されていたが、オートリソソームの形成も減少したため、結果として両欠損細胞内の GAS の生存率は野生型細胞と比べて高かった。以上より、NLRX1 は Beclin 1 と UVRAG と相互作用することで GAS の細胞侵入を抑制し、結果としてオートファゴソームの形成をも抑制する。Beclin 1 については GAS のエンドソームから細胞質への移行にも関与している。さらに、NLRX1-Beclin 1-UVRAG

はオートファゴソーム-リソソーム融合にも関与することが明らかになった。

NLRX1 は自身の NACHT ドメインで Beclin 1 と相互作用し、GAS の細胞侵入とオートファゴソーム-リソソーム融合を制御する

Beclin 1 と相互作用する NLRX1 のドメインを決定するため、NLRX1 の N 末端ドメイン (Nter)、NACHT ドメインおよびロイシンリッチリピート (LRR) ドメインを欠く NLRX1 発現体を構築した。これらの NLRX1 のドメイン欠損発現体を用いて Beclin 1 との免疫沈降を実施したところ、NACHT ドメインを欠く NLRX1 発現体は Beclin 1 と共沈降しなかった。このことから、NLRX1 は NACHT ドメインを介して Beclin 1 と相互作用していることが明らかになった。次に NLRX1 の NACHT ドメインと Beclin 1 の相互作用が GAS 感染時の細胞応答制御に関与しているかを検証するため、作成した NLRX1 ドメイン欠損発現体を Beclin 1 欠損細胞に一過性に強発現させ、細胞応答に変化が起きるかを試験した。NLRX1 の各ドメイン欠損体を Beclin 1 欠損細胞に発現させることで、Beclin 1 欠損細胞で観察された GAS の細胞侵入能の低下は解消された。しかし、NACHT ドメインを欠く NLRX1 を発現させた Beclin 1 欠損細胞でのみ GAS の細胞侵入能の低下は解消されなかった。また、Beclin 1 欠損細胞で確認された初期エンドソーム (EEA1) および後期エンドソーム (Rab7) の陽性細胞の減少は、NACHT ドメインを欠く NLRX1 を発現させた欠損細胞でのみ解消されなかった。同様に、Beclin 1 欠損細胞で確認されたオートファゴソーム形成率およびオートリソソーム形成率の低下も NACHT ドメインを欠く NLRX1 を発現させた欠損細胞でのみ解消されなかった。以上の結果は、NLRX1 が NACHT ドメインを介して Beclin 1 と相互作用し、エンドサイトーシスを介した GAS の細胞侵入およびオートファジーの誘導を制御していることを示唆した。以上の研究成果は 2017 年に発行された *Front Cell Infect Microbiol* 誌に掲載された (Aikawa C, et al. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018)

最後に、本研究で明らかになった Bcl-xL および NLRX1 によるオートファジー-オートファジー制御機構のモデル図 (図 1) を示す。

(3) 今後の研究展開

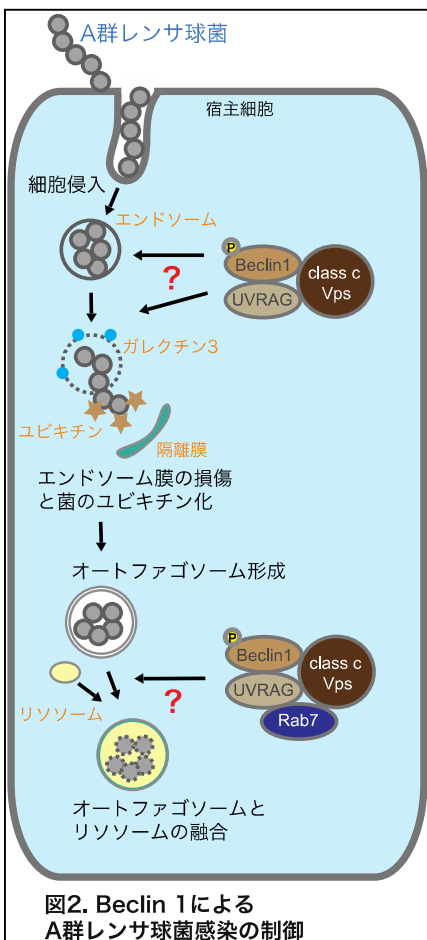


図2. Beclin 1 による A群レンサ球菌感染の制御

上述したように、これまで、細胞侵入性の細菌である GAS 感染時の細胞侵入およびオートファジー誘導過程において Beclin 1 の機能解析を進めてきた。これまでの結果をまとめると、Beclin 1 は i) オートファゴソームの形成そのものには関わらず、オートファゴソーム-リソソームの融合に関わる、ii) 細胞質へと移行した菌のオートファジーによるターゲッティング (ユビキチン化) に関わる、ことが明らかになった。また Beclin 1 は、オートファジー以外に、細胞侵入経路に関わることで、侵入する菌の数を制御していた。このように、細菌感染に対する種々の細胞応答において Beclin 1 の重要性と多機能性が示唆されたが、一方で Beclin 1 がどのように活性化し、どのようなメカニズムでこれらの細胞応答を制御するのか詳細は不明である。そこで、細菌が宿主細胞へと侵入し、最終的にオートファジーにより分解される、という時間軸的に異なる感染ステージでの Beclin 1 の活性化メカニズムと相互作用分子 (群) を同定することで、Beclin 1 による細菌感染制御機構を明らかにすることを今後の目標とする。具体的な実験計画について以下に簡単に述べる。

異なる感染ステージでの Beclin 1 の相互作用分子の同定

Beclin 1 の結合パートナーであり、かつ、GAS の細胞侵入とオートファゴソーム-リソソーム融合の両細胞応答に関連する UVRAG に着目する。UVRAG は Beclin 1 とは異なる結合領域で class c VPS タンパク質群と相互作用し、エンドソームの成熟に関わることが報告されていることから、class c VPS のコアタンパク質 (Vps11、16、18、33A の 4 つ) と Beclin 1 との相互作用を評価する。

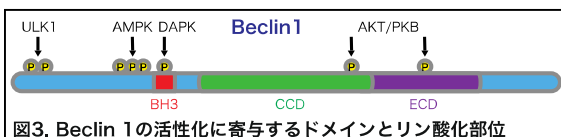


図3. Beclin 1 の活性化に寄与するドメインとリン酸化部位

相互作用が認められたタンパク質をゲノム編集によりロックアウトし、Beclin 1 の制御下にある菌の細胞侵入とオートファゴソーム-リソソーム融合の各細胞応答がどのような影響を受けるか (促進されるのか、抑制されるのか) を解析する。さらに、UVRAG-class cVPS 複合体は Rab7 を活性化してオートファゴソーム-リソソーム融合を促進することも報告されていることから、Beclin 1 と Rab7 の相互作用についても同様に解析を行う (図 2)。

異なる感染ステージでの Beclin 1 の活性化メカニズムの同定

Beclin 1 活性化の指標としてリン酸化に着目する。Beclin 1 は大きく分けて BH3、CCD、ECD の 3 つの領域から構成され、各領域には複数のリン酸化部位が存在する。まず、3 つの領域をそれぞれ欠失した Beclin 1 発現体を作成し、Beclin 1 ノックアウト細胞に安定発現させる。次にこれらの細胞間で、A 群レンサ球菌感染時の異なる感染ステージ、特に、菌の細胞侵入ステージとオートファゴソーム-リソソーム融合ステージにおける各応答の影響を評価し、Beclin 1 ノックアウト細胞と比較することで、各応答に対する Beclin 1 の責任領域を同定する。さらに、責任領域のリン酸化部位について、リン酸化を受けない、不活性型発現体を構築し、Beclin 1 ノックアウト細胞に発現させ、各細胞応答の影響を評価することで、各応答に対して責任を持つリン酸化部位も同定する。最後に、Beclin 1 のリン酸化酵素として知られている、ULK1、DAPK、AMPK、AKT 等のノックアウト細胞あるいは不活性型発現細胞を作成して各ステージの細胞応答を評価することで、Beclin 1 の活性化メカニズムを明らかにする(図3)。

以上の実験計画により、感染ステージごとの Beclin 1 の活性化メカニズムおよび相互作用分子を同定し、Beclin 1 による細菌感染制御機構を明らかにする。一連の研究によって、細胞内の感染防御システムであるオートファジーにおける Beclin 1 の重要性を示すとともに、細菌感染治療における優れた分子標的としての Beclin 1 と相互作用分子の可能性を示すことを目標とする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

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.

Aikawa C, Nakajima S, Karimine M, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Toh H, Yamada S, Nakagawa I. NLRX1 Negatively Regulates Group A *Streptococcus* Invasion and Autophagy Induction by Interacting With the Beclin 1-UVRAG Complex. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Nov 14;8:403. doi: 10.3389/fcimb.2018.00403. eCollection 2018.

[学会発表](計1件)

Chihiro Aikawa, Shintaro Nakajima, Takashi Nozawa, Atsuko Nozawa, Hirotaka Toh, Ichiro Nakagawa. NLRX1 inhibits the Group A *Streptococcus* invasion into host epithelial cells. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27~29日. 福岡国際会議場.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：野澤 孝志

ローマ字氏名：Nozawa Takashi

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院医学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：10598858

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。