

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07109

研究課題名(和文)細菌を認識する細胞内糖鎖センサーによるゼノファジー誘導機構の解明

研究課題名(英文) Xenophagy recognizes bacteria through carbohydrate-binding ubiquitin ligase complex

研究代表者

野澤 孝志 (Nozawa, Takashi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10598858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは宿主細胞内へ侵入した病原性細菌を殺菌することで感染防御に寄与している。本研究では、SCFユビキチンリガーゼ複合体の受容体であるFBX02が、細菌表層糖鎖のGlcNAc側鎖を認識することで、細菌のユビキチン化標識を促進することを明らかにしました。FBX02ノックアウト細胞では、細胞内GAS上のユビキチン蓄積と細菌の分解が減少しました。さらに、SCF複合体因子もまた、GASに対するユビキチンを介したオートファジーに必須でした。したがって、SCF-FBX02は細菌表層糖鎖のGlcNAc残基を認識し、オートファジーによる殺菌を誘導していることが示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ヒト細胞内に侵入した病原菌の糖鎖成分がヒトの受容体によって認識されることで菌がユビキチン化修飾され、免疫経路の一つであるオートファジーが誘導されることが明らかになりました。これは、新たなユビキチン化機構の可能性を示唆しており、生物学的意義の高い知見であると考えられます。今後この認識機構の詳細を明らかにするとともに、この認識メカニズム標的とした創薬につなげることで、新たな感染症制御法の開発に貢献できる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Autophagy degrades invading bacterial pathogens such as group A Streptococcus (GAS) to defend cells. Although invading bacteria are known to be marked with ubiquitin and selectively targeted by autophagy, how ubiquitin ligases recognize invading bacteria is poorly understood. In this study, we show that FBX02, a glycoprotein-specific receptor for substrate in the SCF (SKP1/CUL1/F-box protein) ubiquitin ligase complex, mediates the recognition of GlcNAc side chains of the GAS surface carbohydrate and promotes ubiquitin-mediated autophagy. FBX02 targets cytosolic GAS through its sugar-binding motif and GlcNAc expression on the GAS surface. FBX02 knockout resulted in a decrease in ubiquitin accumulation on intracellular GAS and degradation of bacteria. Furthermore, SCF components are also required for ubiquitin-mediated autophagy against GAS. Thus, we propose that SCF-FBX02 recognizes GlcNAc residues of GAS surface carbohydrates and functions in ubiquitination during autophagy.

研究分野：細菌学

キーワード：オートファジー A群レンサ球菌 糖鎖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

宿主細胞内の分解経路の一つである“オートファジー”は、細胞外から侵入してきた病原細菌を直接的に分解するだけでなく、炎症反応や抗原提示、細胞死などに関わることで細菌感染に対する様々な細胞応答を制御している(病原微生物に対するオートファジーをゼノファジーとよぶ)。しかし、宿主がどのように細菌を認識し、ゼノファジーを誘導するのかは、未だ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

細菌菌体表層の糖鎖分子を認識する糖鎖センサーを同定し、細胞内糖鎖センサーがゼノファジーを誘導する分子メカニズムを解明することで、細菌感染制御に特化したゼノファジーの誘導機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 細菌糖鎖を認識する糖鎖センサーを同定し、ゼノファジーを含む細胞応答における役割を明らかにする。

糖鎖センサー候補として、細胞内で糖鎖を特異的に認識・結合するタンパク質である「細胞内レクチン」に着目する。網羅的に細胞内レクチンの蛍光タンパク質融合体を発現させた細胞に細菌を感染させ、菌周囲に局在化しつつ、糖鎖欠損株への局在が消失するものをスクリーニングする。さらに、局在化が認められた因子の遺伝子を CRISPR/Cas ゲノム編集によりノックアウトし、細胞内細菌のユビキチン化を定量することで、ゼノファジーに関する糖鎖センサーを同定する。

(2) 細菌糖鎖センサーによる TBK1 活性化機構、TBK1 による選択的なゼノファジー誘導機構を明らかにする。

上記項目で同定した細菌糖鎖センサーと相互作用するユビキチンリガーゼを探索するとともに、TBK1 との相互作用能や、TBK1 のリン酸化修飾・ユビキチン化修飾への関与を解析する。また、これまで申請者ら同定してきたゼノファジー制御因子群 (NLRP4, NLRP10, Rab7, Rab9A, Rab17, Rab23, Rab30, Rab35, TBC1D10A, Rabex-5, NDP52, STX6, VAMP3, Vti1b) とセンサー分子との関連性についても解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) 細菌の糖鎖構造がゼノファジーの標的となっている可能性を検証するために、A 群レンサ球菌の表層糖鎖合成遺伝子の欠損株を作成し、ヒト細胞に感染した際のオートファジー誘導を定量した。その結果、A 群レンサ球菌の表層糖鎖の側鎖(GlcNAc)の合成、付加に関わる遺伝子を欠損した変異株では、オートファジーの活性化が有意に低いことが明らかとなった(図1)。また、遺伝子の相補株や、細菌のユビキチン化等を解析した結果、GlcNAc が細菌のユビキチン化誘導に重要な成分であることが明らかとなった。

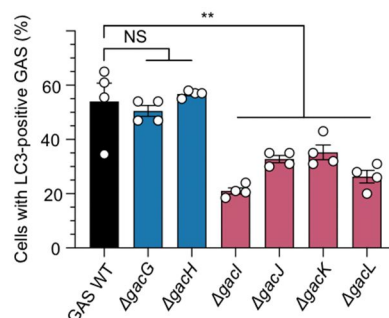


図1 A群レンサ球菌(GAS)変異株のオートファジー誘導

(2) 次に、GlcNAc を認識するユビキチンリガーゼの同定を試みた。2002年に、GlcNAcを含むNグリカンを認識するFBXO2が、ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識に寄与していることが報告されていたため、FBXO2の解析を行った。その結果、FBXO2は細胞質内に侵入したA群レンサ球菌にリクルートすること(図2)また、GlcNAc非産生変異株にはリクルートしないことが明らかとなった。加えて、in vitroの実験において、FBXO2は自身の糖鎖結合モチーフとA群レンサ球菌GlcNAc側鎖を介して結合することを示した。また、CRISPR/Casゲノム編集によりFBXO2ノックアウト細胞を作成し、オートファジーを解析した結果、FBXO2ノックアウト細胞ではA群レンサ球菌に対するユビキチン化とそれによるオートファゴソーム形成が減少し、細胞内での生存

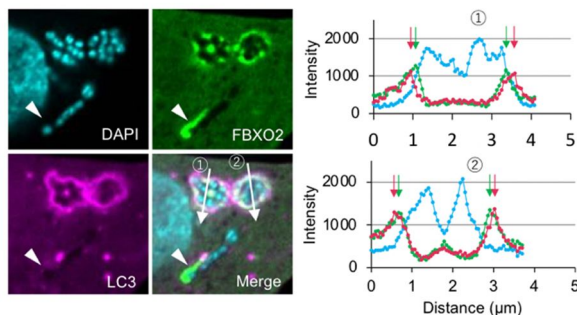


図2 A群レンサ球菌(GAS)にリクルートするFBXO2とLC3

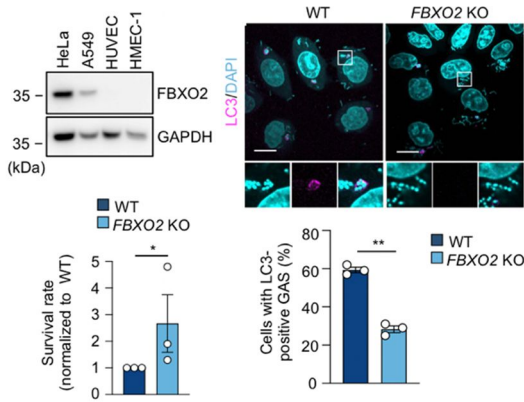


図3 FBXO2ノックアウト細胞では、オートファジー誘導が阻害され菌が増殖する

(3) 細胞内レクチンの局在スクリーニングの結果、ガレクチン3が細胞内に侵入したA群レンサ球菌周囲へリクルートしていた。そこで、ガレクチン3と結合する因子を探索し、GBP1 (Guanylate binding protein 1)を同定した。GBP1もまた細胞内に侵入したA群レンサ球菌へリクルートしていた(図4)。そこで、ガレクチン3ノックアウト細胞を作成し、GBP1の局在を解析したところ、GBP1の菌への局在はガレクチン3依存的であることが示された。また、GBP1ノックアウト細胞では、オートファゴソームの形成率が減少し、殺菌効率も低下していた。以上の結果から、細胞内レクチンであるガレクチン3は、GBP1をリクルートすることで、GBP1を介したオートファジーを制御していることが示唆された。

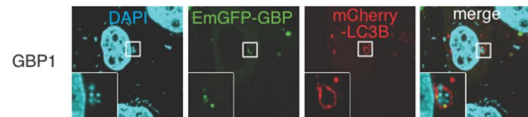


図4 GBP1は菌周囲へリクルートする

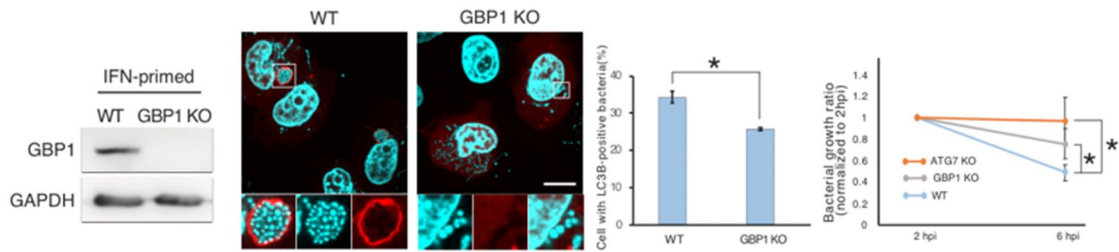


図5 GBP1ノックアウト細胞では、オートファゴソーム形成が減少し、殺菌効率が低下する

(4) 最後に、GBP1が細菌感染時のオートファジー誘導を制御するメカニズムを明らかにするために、GBP1ノックアウト細胞におけるオートファジー制御因子群の局在解析を行った。その結果、菌の認識に関わるユビキチンやガレクチンの局在に影響は見られなかったが、ユビキチンとオートファゴソーム上のLC3をつなぐ役割をもつp62の菌への局在が有意に減少していた。p62は感染時、TBK1キナーゼによってリン酸化されることでユビキチンとの親和性が亢進し、局在化することから、TBK1の活性化(リン酸化)を解析した。その結果、GBP1ノックアウト細胞では、TBK1の活性化が野生型細胞に比べて弱いことが明らかとなった。また、GBP1とTBK1の相互作用を調べたところ、GBP1はTBK1と会合し、最近感染時、共局在を示すことが明らかとなった。以上の結果から、GBP1はガレクチン3依存的に菌周囲へリクルートするとともに、TBK1のリクルートを制御することで、TBK1の自己リン酸化を介した活性化を促し、効率的なオートファジーの誘導を担っていることが示された。

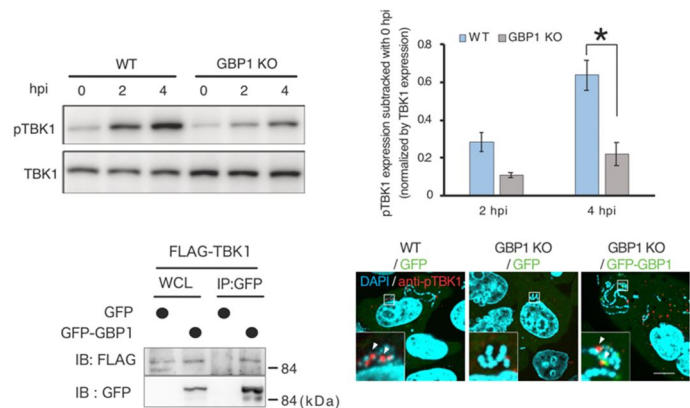


図6 GBP1はTBK1と会合し、TBK1活性化を制御する

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nozawa T, Iibushi J, Toh H, Minowa-Nozawa A, Murase K, Aikawa C, Nakagawa I.	4. 巻 12
2. 論文標題 Intracellular Group A Streptococcus Induces Golgi Fragmentation To Impair Host Defenses through Streptolysin O and NAD-Glycohydrolase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01974-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01974-20.	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 Lin CY, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Toh H, Hikichi M, Iibushi J, Nakagawa I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Autophagy Receptor Tollip Facilitates Bacterial Autophagy by Recruiting Galectin-7 in Response to Group A Streptococcus Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol .	6. 最初と最後の頁 583137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.583137.	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 Nozawa T, Sano S, Minowa-Nozawa A, Toh H, Nakajima S, Murase K, Aikawa C, Nakagawa I.	4. 巻 11
2. 論文標題 TBC1D9 regulates TBK1 activation through Ca2+ signaling in selective autophagy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14533-4.	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 Toh H, Lin CY, Nakajima S, Aikawa C, Nozawa T, Nakagawa I.	4. 巻 9
2. 論文標題 Group A Streptococcus NAD-Glycohydrolase Inhibits Caveolin 1-Mediated Internalization Into Human Epithelial Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol.	6. 最初と最後の頁 398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2019.00398.	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 Toh H, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Hikichi M, Nakajima S, Aikawa C, Nakagawa I.	4. 巻 14
2. 論文標題 Group A Streptococcus modulates RAB1- and PIK3C3 complex-dependent autophagy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2019.1628539.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima K, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Toh H, Yamada S, Aikawa C, Nakagawa I.	4. 巻 15
2. 論文標題 RAB30 regulates PI4KB (phosphatidylinositol 4-kinase beta)-dependent autophagy against group A Streptococcus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 466-477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2018.1532260.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野澤孝志、中川一路
2. 発表標題 Xenophagy induction mechanism during Group A Streptococcus infection
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野澤孝志、藤博貴、野澤敦子、相川知宏、中川一路
2. 発表標題 TBC1D9を介したカルシウムシグナリングはTBK1依存性選択的オートファジーを 制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Proft, Thomas, Loh, Jacelyn (Eds.)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 402
3. 書名 Group A Streptococcus Methods and Protocols	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院医学研究科微生物感染症学分野  <a href="http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp">http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp</a>            プレスリリース：細菌感染を感知してオートファジーを活性化させる仕組みを解明  <a href="http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/200207_1.html/">http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/200207_1.html/</a>            プレスリリース：人食いバクテリアの新たな免疫回避機構を発見  <a href="https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-02-15">https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-02-15</a></p>
---

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
研究 分 担 者	相川 知宏  (Aikawa Chihiro)  (70725499)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	

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
---------	---------