

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K07537

研究課題名(和文)細菌感染時の異なるステージを制御するBeclin 1の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Beclin 1 regulating different stages 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Beclin 1は、栄養飢餓時に誘導される細胞内の非選択的自己成分分解機構であるオートファジーと細菌感染時に誘導される選択的オートファジーの両者の誘導に重要である。我々はこれまでに Beclin 1が細菌の細胞侵入を制御することを明らかにしているが、本研究においてBeclin 1を構成する3つの領域のうち、ECDがA群レンサ球菌の細胞侵入を制御する責任領域であると同定した。また、詳細なシグナル解析から、A群レンサ球菌は宿主細胞のインテグリンへの結合を介してILK1を活性化し、これがAKTの活性化、最後に Beclin1-ECDの活性化を介してGASの細胞侵入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

Beclin 1が細菌に対する選択的オートファジーの制御だけでなく、細菌の宿主細胞への侵入制御にも関与することは、本分子が異なる感染ステージにおいて重要なマルチロールプレーヤーとして宿主の感染制御に貢献していることを示唆している。本研究で得られた結果は、細菌と宿主間の相互作用を明らかにする上で学術的に意義のあるものであり、また細菌感染を制御する新たな薬剤の標的としてBeclin 1およびその相互作用分子の有用性を示したことは、社会的に意義があったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Beclin 1 is important for the induction of both autophagy, an intracellular non-selective autophagosomal degradation mechanism induced during nutrient starvation, and selective autophagy induced during bacterial infection. We have previously shown that Beclin 1 regulates bacterial host cell invasion, and in this study, we identified ECD as the domain responsible for regulating cell invasion by Group A Streptococcus (GAS). In addition, detailed molecular analysis in GAS-infected cells revealed that GAS activates ILK1 through binding to host cell integrins, which in turn regulates GAS cell invasion via activation of AKT and finally Beclin 1-ECD.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 Beclin 1 細胞侵入

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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自然・獲得免疫といった様々な手段を駆使して病原微生物の感染に対抗している。しかし、一部の病原性細菌は、これらの防御機構を突破して宿主細胞内にまで侵入する。細胞内への侵入を果たした細菌に対しても生体側は対抗手段を持たない訳ではなく、金属中毒や酸化ストレスなどを誘導して対抗している。オートファジーと呼ばれる分解機構も細胞内に侵入した細菌への対抗手段として機能している。オートファジーは長年、栄養飢餓時に細胞内のオルガネラやタンパク質を“非選択的”に分解し、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が、細胞内に侵入した微生物の排除にも寄与していること、この場合には細胞内の微生物を“選択的”に認識して誘導されることが明らかになっている (Gatica D, et al. *Nat Cell Biol.* 2016)。現在までに様々なウイルス、寄生虫、細菌といった細胞侵入性の微生物とオートファジーの関わりが報告されており、このような微生物に対する選択的オートファジーのことはゼノファジーと呼ばれている (Nakagawa I et al., *Science*. 2004, Gutierrez MG., et al. *Cell*. 2004, Ogawa M., et al. *Science*. 2005)。

非選択的なオートファジーの誘導過程において、Beclin 1 (Atg6 の哺乳類ホモログ) は autophagy-related genes (Atg)14, Rubicon, UVRAG 等の分子と相互作用して複合体を形成する。これらの複合体は次にクラス III の脂質キナーゼ PI3KC3/Vps34 と相互作用してその活性を制御し、オートファジーの誘導を促進あるいは抑制する。一方、ゼノファジーの誘導過程、例えばアプラズマ感染時には、本菌の分泌タンパク質 Ats-1 が Beclin 1-Atg14 複合体を活性化し、オートファゴソーム形成を促進する (Niu et al., *PNAS*. 2012)。また、病原体認識レセプター (Nod-like receptor, NLR) である NLRP4 が Beclin 1 と結合することで、A 群レンサ球菌感染時のゼノファジーの誘導を抑制する (Jounai et al., *J Immunol.* 2011)。我々も最近、NLRs の 1 つ NLRX1 が Beclin 1 と相互作用することで、A 群レンサ球菌感染時のオートファゴソーム-リソソーム融合を抑制することを明らかとした (Aikawa et al., *Front cell infect mi.* 2018)。また、同誌においては Beclin 1 が A 群レンサ球菌の細胞侵入を制御していることを明らかにした。このように Beclin 1 は選択、非選択にかかわらずオートファジーの制御に関与するだけでなく、細菌の感染後の異なるステージでの役割を果たしていることが分かってきた。

2. 研究の目的

細胞侵入能は細菌にとって強力な武器であり、抗生物質による殺菌や免疫担当細胞による貪食を回避し、増殖に必要な栄養源を得る。しかし、宿主も細胞侵入を果たした菌に対し、エンドサイトーシス経路やゼノファジーを誘導し、最終的にリソソーム内で菌を分解することで対抗している。よって、エンドサイトーシス経路とゼノファジーの両者を制御する Beclin 1 は、細胞内の感染防御システムにとって“要の分子”といえる。ただし、ゼノファジーへの関与に比べて、Beclin1 による細菌の細胞侵入への寄与については、その分子機構の詳細は明らかではない。そこで本研究では、Beclin 1 を介したエンドサイトーシス経路の制御機能を明らかにすることを目的とした。

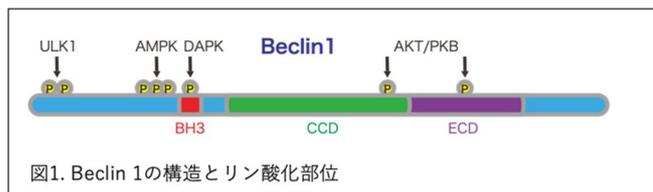
3. 研究の方法

使用細菌と細胞

本研究では細胞侵入性の病原性細菌として A 群レンサ球菌 (GAS) JRS4 株を使用した。GAS は、細胞侵入能を持たない細菌であると長年考えられてきたが、近年では宿主の上皮細胞に侵入すること、細胞内ではゼノファジーによる分解排除を受けることが明らかになっている (Nakagawa I et al., *Science*. 2004)。上皮細胞は子宮頸がん由来細胞である HeLa 細胞の野生型細胞と種々の遺伝子の欠損させた変異 HeLa 細胞を用いた。

細菌のエンドサイトーシスを制御する Beclin 1 の責任領域の決定

Beclin 1 分子の機能領域は 3 つあり、それぞれ Bcl-2 Homology3 domain (BH3)、Coiled coil domain (CCD)、Evolutionally conserved domain (ECD) と呼ばれる (図 1)。これらの 3 つの領域をそれぞれ欠損した細胞を作成した。これらの細胞に GAS を感染させ、GAS の細胞侵入能を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。



Beclin 1 のリン酸化キナーゼの同定

Beclin 1 の ECD は Akt によりリン酸化されることが知られていることから (Wang RC et al., *Science*. 2012)、Beclin 1 と Akt の相互作用を免疫沈降法により観察した。また、野生型細胞

および Beclin 1 の ECD を欠損する細胞 (Beclin 1⁻ ECD) に GAS を感染させ、感染後経過的的に回収した細胞溶解液に対して、リン酸化 Beclin 1 抗体およびリン酸化 Akt 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

Akt のリン酸化と GAS の細胞侵入に寄与するキナーゼの同定

ILK は Akt をリン酸化し、GAS の細胞侵入を促進するため (Delcomenne M et al., *PNAS*, 1998)、ILK1 の欠損細胞を用いて GAS の細胞侵入能を観察した。細胞侵入能はゲンタマイシンプロテクションアッセイおよび細胞内のエンドソーム形成能で評価した。

4. 研究成果

4-1. 結果

4-1-1. GAS の細胞侵入を制御する Beclin 1 の責任領域は ECD である

Beclin 1 の BH3、CCD、ECD を欠損させた細胞 (BH3⁻, CCD⁻, ECD⁻) に GAS JRS4 株を感染させ、本菌の細胞侵入率を算出した。この結果、ECD 細胞への GAS の細胞侵入率は Beclin 1 の全長欠損株と同定程度まで減少していた。一方で BH3、CCD 細胞への GAS の侵入率は野生型細胞への侵入率と変わらなかった (図 2)。このことから、GAS の細胞侵入を制御する Beclin 1 の責任領域は ECD であることが示唆された。

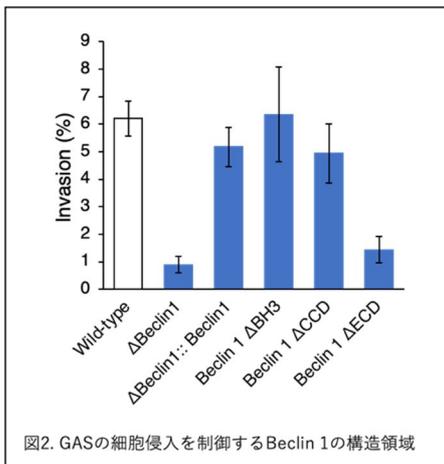


図2. GASの細胞侵入を制御するBeclin 1の構造領域

4-1-2. ECD は Akt によってリン酸化される

図 1 に示すように、Beclin 1 は機能領域ごとに複数のキナーゼによりリン酸化され、様々な細胞プロセスに関与している。GAS の細胞侵入能を制御する Beclin 1 の構造領域が ECD であったことから、この領域のリン酸化キナーゼである Akt (Wang RC et al., *Science*, 2012) に着目して解析を行なった。免疫沈降を行なった結果、Beclin 1 は Akt と感染、非感染時の両時間で共沈降し、両者が相互作用していることが明らかになった (図 3)。また、GAS 感染によって野生型細胞における Beclin 1 のリン酸化レベルは増加した。GAS を感染させた ECD 細胞のリン酸化レベルは野生型細胞のものより顕著に減少していた (未発表データ)。また、Akt の上流に存在する PI3 キナーゼの阻害剤 (WM: wortmannin および LY: LY294002) で Beclin1 細胞を処理すると、GAS の細胞侵入率はさらに減少した。このことから、Beclin 1 の ECD が Akt にリン酸化されることで GAS の細胞侵入を制御していることが示唆された。

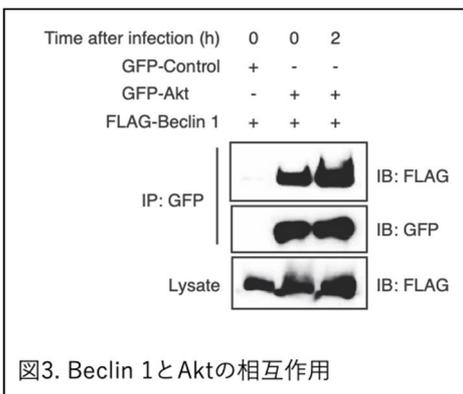


図3. Beclin 1 と Akt の相互作用

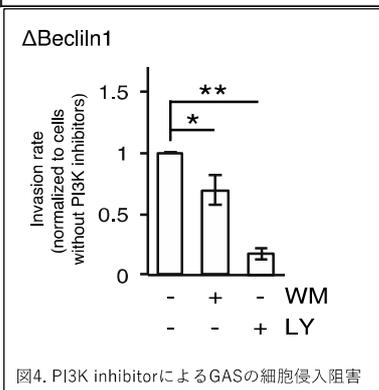


図4. PI3K inhibitorによるGASの細胞侵入阻害

4-1-3. Beclin 1 は ILK-Akt 経路を介して GAS の細胞侵入を制御する

GAS 感染細胞において、ILK は Akt をリン酸化することで GAS の細胞侵入を促進することが報告されている (Delcomenne M et al., *PNAS*, 1998)。これまでの結果から、Akt は Beclin 1 との相互作用により Beclin 1 の ECD をリン酸化し、GAS の細胞侵入を制御していたことから、Akt のリン酸化を担う ILK も GAS の細胞侵入能を制御すると考えた。このため、ILK1 の欠損細胞を作成し (図 5A) この細胞に対する GAS の細胞侵入能を解析した。ILK 欠損細胞に対する GAS の細胞侵入能は野生型細胞のものと比較して顕著に減少した。同様に、細胞内へと侵入した GAS を

FYVE および Rab7 を指標としたエンドソーム形成能で評価したところ、ILK 欠損細胞内に形成されるエンドソームの数は野生型細胞内での観察される数より顕著に減少していた(図 5B, C, D)。このことから、GAS の感染に対して、ILK は Akt をリン酸化することでこれを活性化し、続いて活性化(リン酸化)Akt が Beclin 1 との相互作用する中で Beclin 1-ECD をリン酸化することで GAS の細胞侵入を制御していることが明らかになった。

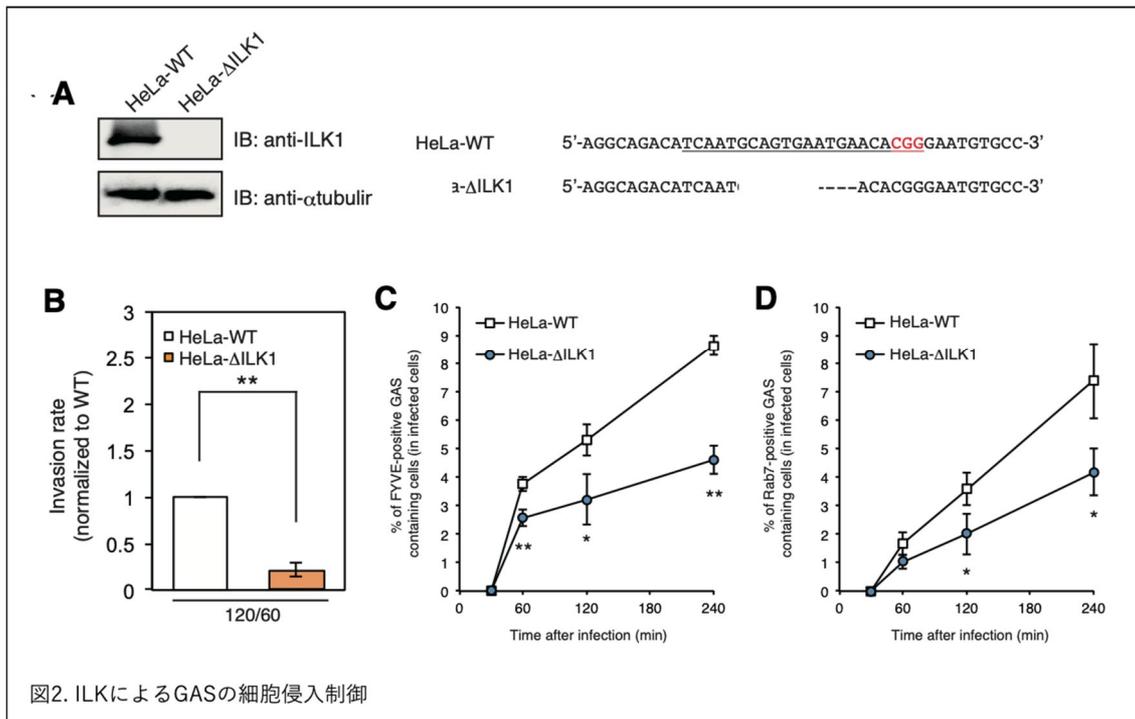


図2. ILKによるGASの細胞侵入制御

4-2. 考察

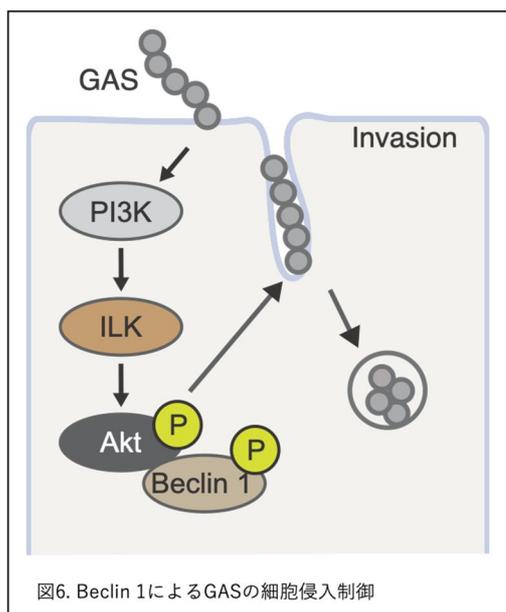
GASは上皮細胞に侵入することにより、様々な宿主防御システムや抗生物質から保護されるだけでなく、細胞内でのコロニー形成や細胞間拡散を可能にしている。多くの場合、菌体表層のMタンパク質とフィブロネクチン結合タンパク質(Sfbl/prtF1)を介したGASの細胞侵入は、PI3Kの活性化を必要としている(Wang et al., *Cell Microbiol.* 2006, 2007)。PI3Kは、膜に結合したフォスファチジルイノシトール(PtdIns)のリン酸化を触媒し、ILK、Akt、Rac1などの下流ターゲットに結合して、PI3K依存的にアクチン細胞骨格のリアレンジメントを促進する(Fruman, Meyers, & Cantley., *Annu Rev Biochem.* 1998; Qian et al., *Oncogene.* 2005)。

Beclin 1複合体のオートファジー制御における重要性はよく知られているが、この複合体はエンドサイトーシスや液胞タンパク質ソーティングを含む複数の小胞輸送イベントにも関与することが示されている(Funderburk et al., *Trends Cell Biol.* 2010, Itakura et al., *Mol Biol Cell.* 2008; Kihara et al., *J Cell Biol.* 2001; Liang et al., *Nat Cell Biol.* 2008)。また我々は、抗アポトーシス分子であるBcl-xLとBeclin 1の相互作用によってGASの細胞侵入が抑制されるが、UVRAG過剰発現によってこの抑制が解除されることから、GASの細胞侵入過程ではBeclin 1-UVRAG複合体形成が必要なことを明らかにしている(Nakajima and Aikawa et al., *PLoS One.* 2016)。我々はまた、Beclin 1との相互作用分子であるクラスIII PI3KであるVps34/PI3KC3を発現抑制しても、細胞侵入するGASの数に影響が見られないことから、Vps34/PI3KC3はGASの細胞侵入過程には寄与しないことを明らかにしている(Aikawa et al., *Front cell infect mi.* 2018)。つまり、Beclin 1を介したエンドサイトーシス経路には、クラスIあるいはクラスIIのPI3Kが生成するPtdInsが関与していることが示唆される。

本研究において我々は、Beclin 1のECDがGASの細胞侵入経路を制御する責任領域であることを明らかにした。Beclin 1を構成するBH3、CCD、ECDにはそれぞれリン酸化サイトが1つ以上存在し、またこれらのサイトをリン酸化するキナーゼも複数存在していることが知られている(図1)。ECDはAktによりリン酸化されることが報告されていたが(Wang RC et al., *Science.* 2012)、我々の解析からもBeclin 1がAktと相互作用していること、またGAS感染時のECD細胞におけるBeclin 1のリン酸化レベルが顕著に減少することが確認されており、AktによるBeclin 1 ECDのリン酸化プロセスがGASの細胞侵入には必要であることが示唆された。また、複数のPI3Kの阻害剤を用いた解析から、Beclin 1をリン酸化するAktの活性化は最上流のPI3Kの活性化に依存的であることも示唆された。

我々は GAS 感染時に Akt を活性化する分子として ILK1 同定した。ILK は PI3K 依存的に機能して下流にある Akt や PKB 等の活性化に寄与しているが (Delcomenne M et al., *PNAS*. 1998) ILK を欠損させた細胞では GAS のエンドサイトーシス経路は顕著に抑制された。現時点では GAS 感染時に ILK と Beclin 1 が直接ないし間接的に相互作用するのか、そして ILK 欠損細胞における Akt のリン酸化レベルや Beclin 1 のリン酸化レベルが減少しているのかの 2 点については解析に至っていないことから、Beclin 1 と ILK の関連性の詳細を明らかにすることは今後の課題と言えるだろう。また、本経路の最上流に位置する PI3K は少なくともクラス III の PI3K ではないが、クラス I、クラス II のどちらの PI3K が GAS 感染時に駆動して本菌の細胞侵入の制御に寄与しているかについても今後明らかにしていく必要がある。さらに、本報告書では詳しく言及していないが、我々は Beclin 1 がオートファジー関連分子の 1 つである Atg9 と相互作用すること、Atg9 の欠損細胞あるいはサイレンシング細胞細胞では GAS の細胞侵入が抑制されるという結果を得ている。Atg9 は PI3K の下流にある Rac1 との相互作用も報告されていることから、PI3K と種々の下流因子、そして Beclin 1 が複雑かつ密接に相互作用して GAS の細胞侵入過程が制御されていることが示唆される。

本研究により、Beclin 1 は PI3K-ILK-Akt 経路との相互作用を介して GAS の細胞侵入を制御していることが示された (図 6)。細胞への侵入は GAS 感染症の初期過程の一部であるものの、本研究によって、GAS の上皮細胞への侵入と、これに対して宿主が繰り出す様々な細胞プロセスにおける Beclin 1 の機能と役割について理解が深まることは、細胞侵入性病原体と宿主細胞の相互作用の基本的な側面に関するさらなる研究の発展に大きく寄与することが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

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 Nature Communicattion	6. 最初と最後の頁 1-16
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 Tanaka M, Kinoshita-Daitoku R, Kiga K, Sanada T, Zhu B, Okano T, Aikawa C, Iida T, Ogura Y, Hayashi T, Okubo K, Kurosawa M, Hirahashi J, Suzuki T, Nakagawa I, Nangaku M, Mimuro H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Group A Streptococcus establishes pharynx infection by degrading the deoxyribonucleic acid of neutrophil extracellular traps.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60306-w.	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 Nature Communications	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 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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. eCollection 2019.	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 16
2. 論文標題 Group A Streptococcus modulates RAB1- and PIK3C3 complex-dependent autophagy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 334-346
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 -

〔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 相川 知宏, 長門石 暁, 中木戸 誠, 妹尾 暁暢, 星野 将人, 野澤孝志, 村瀬一典, 津本 浩平, 中川 一路
2. 発表標題 A群レンサ球菌の増殖に必要な鉄獲得機構に対する阻害剤の探索
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相川 知宏, 星野 将人, 中木戸 誠, 長門石 暁, 村瀬 一典, 津本 浩平, 中川 一路
2. 発表標題 化合物 H1 の A 群レンサ球菌増殖抑制メカニズムおよび抗菌薬との併用効果の検証
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	野澤 孝志 (Nozawa Takashi) (10598858)	京都大学・医学研究科・准教授 (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
---------	---------