

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462776

研究課題名(和文) 病原性細菌を標的とした選択的オートファジーの特異な膜動態とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of selective autophagy against bacterial pathogens

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に感染した病原細菌を殺菌するオートファジーの膜動態制御メカニズムの解析を行なった。膜輸送制御因子ファミリーであるRab GTPaseの網羅的解析の結果、Rab35を介したオートファジーアダプターNDP52の制御メカニズムを明らかにした。また、細胞内レセプターであるNLRP4は侵入した細菌を認識し、細胞骨格制御因子であるRhoシグナルを調節することでリサイクリングエンドソームとオートファゴソームの融合を促進し、膜の伸長を制御していることが明らかになった。すなわち、細胞内において病原体の認識からオートファジーの膜動態を制御する分子機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive analysis of Rab GTPase family proteins in autophagy against bacterial pathogens. We identified Rab35 as a novel autophagy regulator. Rab35 binds to NDP52 and regulates the recruitment of NDP52 to invading bacteria. We also found that NLRP4, intracellular pattern recognition receptor, is recruited to invaded bacteria and regulates Rho signaling via RhoGDI to promote the fusion between recycling endosomes and autophagosomes. The fusion step is required for the extension of autophagosome membranes and form complete autophagosomes. Taken together, we revealed how host cells recognize pathogens and induce selective autophagy.

研究分野：細菌学

キーワード：オートファジー Rab GTPase

1. 研究開始当初の背景

オートファジー (自食作用) とは、真核生物に保存された細胞内における自己成分分解システムである。また、オートファジーは自己成分だけでなく、細胞内に侵入してきた病原微生物を標的として分解する免疫システムとしても機能している。病原細菌の多くはエンドソーム・ファゴソームを介して細胞内へ侵入した後、毒素を分泌することが膜を破壊し、細胞質へ脱出する。この膜傷害・細胞質への侵入によってゼノファジーは活性化し、隔離膜と呼ばれる膜構造が菌を包み込み、二重膜のオートファゴソームとなり、リソソームと融合することで細菌を殺菌する。オートファゴソームには基質の選択性がないため、細菌を特異的に分解するためには、細菌とオートファゴソームをつなぐ何らかのアダプタータンパク質が必要となる。細胞内に侵入した細菌には目印としてユビキチン鎖が付加され、このユビキチンと、オートファゴソームの構成タンパク質である LC3 の両者に結合するタンパク質がアダプタータンパク質であると考えられている。これまでに、p62/SQSTM1、NDP52、optineurin (OPTN)、NBR1 などがアダプタータンパク質として報告されているが、それぞれの役割の違いや細菌種に応じた使い分け、加えて制御メカニズムについても不明であった。

2. 研究の目的

病原性細菌を標的とした選択的オートファジーの特異な膜動態とその分子メカニズムの解明を目的とし、i) 細菌認識に関わるオートファジーアダプタータンパク質と細菌との相互作用から、細菌種に応じたアダプターの使い分けとその制御メカニズムを明らかにし、ii) 細菌感染時特異的なオートファゴソーム膜形成の制御因子を同定し、それらの時空間的なダイナミクスを解析することで、細菌集団を包み込む巨大なオートファゴソームの膜新生及び膜供給機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細菌種に応じたアダプタータンパク質の使い分けとその制御機構の解明

① 細菌の保有するアダプタータンパク質抑制因子の同定とその抑制機構解析

② アダプタータンパク質の活性化と菌への輸送に関わる因子の同定とその分子機構解析

(2) 細菌集団を包み込む巨大なオートファゴソームの膜新生・膜供給機構の解明

① 感染時特異的にオートファジーを制御する Rab ファミリータンパク質と Rab 不活性化酵素ファミリー (RabGAP) の網羅的解析と相互作用因子の同定

② 細菌感染細胞におけるオルガネラマーカータンパク質の局在解析による、細菌種に応じたオートファゴソーム膜の供給源の同定

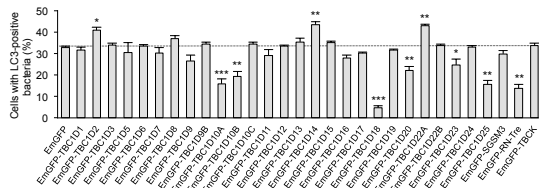
とその輸送機構解析

4. 研究成果

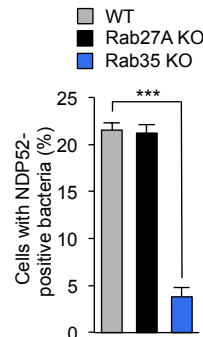
(1) リサイクリングエンドソーム (RE) を介したオートファゴソーム形成メカニズム
細菌感染時のオートファゴソームの膜成分の供給源として、RE を報告している (Cell Microbiol. 2014)。RE とオートファゴソームとの融合を制御する SNARE タンパク質を探索し、Syntaxin 6 (Stx6)、VAMP3、Vti1b を同定した。STX6、VAMP3、Vti1b はいずれもオートファゴソーム上の RE マーカータンパク質と共局在し、互いに相互作用していた。また、RNAi によるノックダウンにより RE とオートファゴソームとの融合が抑制され、完全なオートファゴソームが減少した。つまり、STX6-VAMP3-Vti1b 複合体が RE とオートファゴソームとの融合を調節することで、細菌を包む巨大なオートファゴソームの形成していることが示唆された。以上の成果は Autophagy 誌に発表した (2016)。

(2) Rab タンパク質によるアダプター分子の制御機構

Rab GTPase-activating proteins (RabGAP) の過剰発現系によるスクリーニングの結果 (下図)、TBC1D10A が GAP 活性依存的にオートファゴソーム形成を抑制していることを明らかにした。

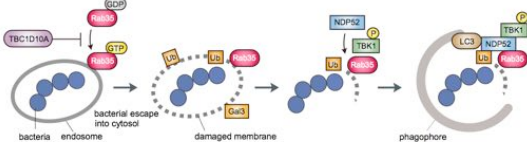


TBC1D10A は Rab27A と Rab35 に対して GAP 活性を示すことから、Rab27A、Rab35 を CRISPR/Cas ゲノム編集システムを用いてノックアウトし、オートファジー解析を行った結果、Rab35 がオートファゴソーム形成に関与していることが明らかとなった (下図)。



さらに、TBC1D10A と Rab35 は、アダプタータンパク質のひとつである NDP52 の菌周囲へのリクルートを特異的に制御し、ユビキチンが標識された基質 (細菌) と NDP52 との結合を制御していることが明らかとなった。NDP52 は細菌周囲に蓄積したユビキチンと結合することが知られていたが、Rab35 ノック

クアウト細胞では、NDP52 とユビキチンとの結合も減少していた。さらに、NDP52 と Rab35 との結合を制御する因子を探索した結果、TBK1 キナーゼを同定した。TBK1 キナーゼの活性阻害剤を添加、もしくは TBK1 をノックアウトすることで、Rab35 と NDP52 の相互作用が阻害された。さらに、オートファゴソーム形成も抑制された。こうした Rab35 と TBK1 を介した NDP52 の制御メカニズムは、細菌分解においてだけでなく、ミトコンドリアの分解や飢餓誘導オートファジーの成熟にも関与していた。以上の成果は現在論文投稿中である。

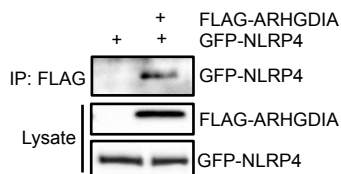


(3) LAMTOR2 の機能解析

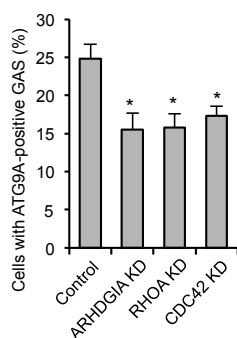
アダプタータンパク質の TAX1BP1 ノックアウト細胞を解析した結果、リソソームが融合したオートファゴソームが減少していた。TAX1BP1 の制御因子を探索した結果、LAMTOR2 を同定した。LAMTOR2 は TAX1BP1 と LC3 と結合し、LAMTOR2 のノックアウトにより TAX1BP1 のリクルートとリソソーム融合が阻害された。

(4) NLRP4 の機能解析

細胞内パターン認識受容体のひとつである NLRP4 を解析した結果、細菌の侵入にตอบสนอง、菌周囲へと蓄積すること、オートファゴソームの形成を促進する因子であることを明らかにした。さらに相互作用因子を探索し、RhoGDI を同定した (下図)。

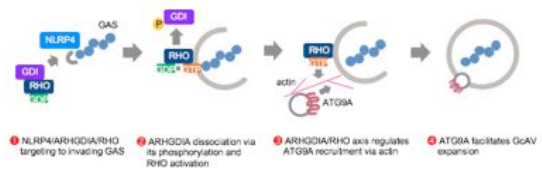


RhoGDI は直接 NLRP4 の NACHT ドメインに結合し、オートファゴソームに局在した。NLRP4 をノックダウンした細胞では菌周囲への RhoGDI と Rho タンパク質の局在化が減少したことから、NLRP4 によって RhoGDI



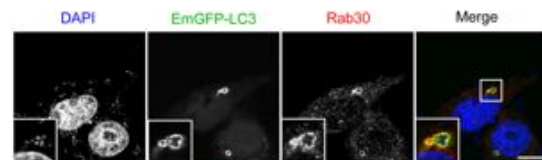
及び Rho タンパク質がオートファゴソームへとリクルートされていると考えられた。Rho シグナルはアクチン骨格を介した小胞輸送を制御すること、またオートファゴソーム形成に重要な Atg9 輸送はアクチンを介していること

から、NLRP4/Rho が Atg9 の輸送制御に関与するかどうかを解析した。その結果、NLRP4/Rho によって、Atg9 陽性小胞が菌を包み込むオートファゴソームへの輸送を調節していることが明らかになった。

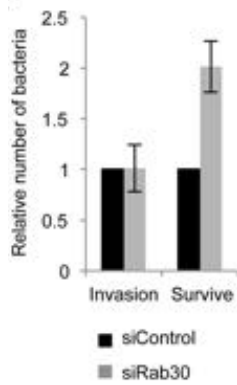


一連の成果は Autophagy 誌に発表した (2017, in press)。

(5) 新規ゼノファジー制御因子 Rab30 の同定 Rab GTPase ファミリータンパク質の網羅的な局在解析を行った結果、Rab30 がオートファゴソームと共局在することを新たに同定した (下図)。



Rab30 は通常ゴルジ体に局在しており、細菌感染時にオートファゴソームへと局在を移行させていた。また、GDP 結合型の Rab30 は細胞質局在を示し、オートファゴソームへは局在しなかったが、GTP 結合型の Rab30 は高頻度でオートファゴソームに局在していた。すなわち、Rab30 は GDP/GTP サイクリングにおいて、活性化型でオートファゴソームアンカーされているものと考えられた。さらに、Rab30 の機能を明らかにするため、Rab30 をノックダウンし、オートファジーを解析した。その結果、オートファジーの活性化に伴って起きるユビキチン化、アダプタータンパク質群の蓄積には影響が見られなかったが、オートファゴソームのマーカータンパク質である LC3 のリクルートが有意に減少していた。この結果から、Rab30 は感染に対するオートファゴソームの形成に重要なタンパク質であることが示唆された。Rab30 はゴルジ体に局在し、ゴルジ体の形態維持に重要であることが知られていた。そこで、Rab30 のノックダウンによるオートファゴソームの形成阻害が、ゴルジ体の形態変化による結果であるか否かを検証した。その結果、ゴルジ体の形態変化自体にオートファゴソームへの影響は認められなかった。最後に、Rab30 のノックダウンによるオートファゴソーム形成抑制が、細菌の細胞内増殖に及ぼす影響を調べた結果、コントロール細胞に比べて、Rab30 をノックダウンした細胞では、細胞内の生菌数が有意に増加した (下図)。



つまり、Rab30 は細菌感染に対するオートファゴソームの形成に関与し、菌の殺菌作用に重要な因子であることが明らかとなった。以上の結果は PLoS One 誌に発表した (2016)。

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 7 件)

1. Okura M, Nozawa T, Watanabe T, Murase K, Nakagawa I, Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T, Gottschalk M, Hamada S, Maruyama F. A locus encoding variable defence systems against invading DNA identified in *Streptococcus suis*. *Genome Biol Evol.* 2017 Apr 4. doi: 10.1093/gbe/evx062.
2. Roobthaisong A, Aikawa C, Nozawa T, Maruyama F, Nakagawa I. YvqE and CovRS of Group A *Streptococcus* Play a Pivotal Role in Viability and Phenotypic Adaptations to Multiple Environmental Stresses. *PLoS One.* 2017 Jan 25;12(1):e0170612.
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.

4. Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Aikawa C, Nakagawa I. The STX6-VTI1B-VAMP3 complex facilitates xenophagy by regulating the fusion between recycling endosomes and autophagosomes. *Autophagy.* 2017 Jan 2;13(1):57-69.
5. Kulkarni T, Aikawa C, Nozawa T, Murase K, Maruyama F, Nakagawa I. DNA-based culture-independent analysis detects the presence of group a streptococcus in throat samples from healthy adults in Japan. *BMC Microbiol.* 2016 Oct 11;16(1):237.
6. Oda S, Nozawa T, Nozawa-Minowa A, Tanaka M, Aikawa C, Harada H, Nakagawa I. Golgi-Resident GTPase Rab30 Promotes the Biogenesis of Pathogen-Containing Autophagosomes. *PLoS One.* 2016 Jan 15;11(1):e0147061.
7. W. Paveenkittiporn, T. Nozawa, S. Dejsirilert, I. Nakagawa, S Hamada. Prevalent emm types and superantigen gene patterns of group A *Streptococcus* in Thailand. *Epidemiol. Infect.* 12:1-6, 2015

[学会発表] (計 3 件)

1. 野澤孝志、ゼノファジーにおけるオートファジーアダプタータンパク質の時空間制御メカニズム、第 90 回日本細菌学会総会、2017.3.17、仙台市
2. 野澤孝志、A Disrupted PI4P-Enriched TGN Induced by Group A *Streptococcus* Contributes to Xenophagy、第 89 回日本細菌学会総会、2016.3.23、大阪市
3. 野澤孝志、Rab17-mediated recycling endosomes contribute to antibacterial autophagosome formation、第 88 回日本細菌学会総会、2016.3.26、岐阜市

[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

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

(2)研究分担者

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