

論文の内容の要旨

論文題目 リステリアのオートファジー認識からの回避機構の解明

指導教員 笹川 千尋 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

病因・病理学 専攻

氏名 吉川 悠子

オートファジーは細胞内分解系の一つであり、飢餓や酸化ストレスなどによりアミノ酸の臨時供給のために誘導される。オートファジーは定常時にも基底レベルで起きており、細胞内の不要なタンパク質や細胞内小器官を分解し、細胞の恒常性の維持に寄与している。近年までオートファジーは細胞質成分を非特異的に大規模分解する機構であると考えられていた。しかし、最新の研究結果から、オートファジーが病原細菌や不要になった細胞内小器官などを選択的に認識し、分解しているという知見が得られており、タンパク質代謝のみならず自然免疫、発生・分化、細胞死など多彩な機能を果たしていることが明らかとなっている。

細胞内寄生菌であるリステリア(*Listeria monocytogenes*)は感染細胞内において効率的にオートファジーから逃れ、菌体表面に発現した ActA タンパク質によってアクチン重合を促進し、菌体の一極にアクチンコメットを形成して細胞内を

運動することで細胞から細胞へと感染を拡大する。そこで、本研究ではリステリアのオートファジーによる認識および回避機構を明らかにすることを目的とした。リステリア野生株(WT)と菌の細胞間拡散に関与するレシチナーゼオペロンに含まれる遺伝子の各種非極性欠失変異株[$\Delta actA$ (アミノ酸 20-602 残基欠損; $\Delta actA2$)株、 $\Delta plcB$ 株、 $\Delta orfX$ 株および $\Delta orfZ$ 株]をオートファジーのマーカーである GFP-LC3 を恒常的に発現する MDCK (madine-darby canine kidney)細胞 (MDCK/pGFP-LC3)に感染させて、リステリア感染によるオートファジーの誘導性を比較した。その結果、感染 2 時間後において GFP-LC3 陽性を示す菌体の割合が $\Delta actA2$ では他の株を比べて有意に上昇した。次に、 $\Delta actA2$ を感染させた MDCK/pGFP-LC3 細胞をオートファジーの抑制剤である 3-MA (3-methyladenin) で処理すると、GFP-LC3 陽性を示す菌の割合が有意に低下した。さらに、MDCK 細胞内での菌の増殖を経時的に測定したところ、感染 4 時間後において $\Delta actA2$ の細胞内生菌数の増加は WT と比べて有意に抑制され、3-MA 処理により両者の差は消失した。また、野生型($atg5^{+/+}$)および Atg5 ノックアウト($atg5^{-/-}$) MEF (mouse embryonic fibroblast)細胞を用いて同様に菌の増殖を測定したところ、MDCK 細胞の場合と同様に感染 4 時間後において $atg5^{+/+}$ MEF 細胞では $\Delta actA2$ の細胞内生菌数の増加が WT と比べて有意に抑制されたのに対し、オートファジー不能である $atg5^{-/-}$ MEF 細胞では両者の差が消失した。このことは、 $\Delta actA2$ が細胞内においてオートファジーにより認識され、最終的に分解・殺菌されていることを示している。 $\Delta actA2$ を感染させた MDCK 細胞の透過型電子顕微鏡による解析を行った結果、オートファゴソームに特徴的な多層の膜構造体に菌体を取り囲まれている像が観察された。以上の結果から、リステリアの細胞内運動性に必須の菌体表面タンパク質である ActA がオートファジーからの回避に必要であることを明らかとした。

さらにアクチン重合に関与する宿主タンパク質である Arp2/3 複合体、Ena/VASP (enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein; VASP)および F-アクチン

との結合部位を欠損またはアミノ酸置換した各種変異 ActA 発現株を相同組み替えにより作製し、ActA のアクチン重合作用による菌の運動性とオートファジーとの関連について検討した。その結果、これら宿主タンパク質との結合性をすべて欠く変異 ActA 発現株($\Delta actA21$)は $\Delta actA2$ と同じようにオートファジーを回避することは出来なかったが、Arp2/3 複合体および VASP のどちらか片方とさえ結合可能な変異 ActA を発現する菌は細胞内での運動性の有無に関係なくオートファジーを回避できることが明らかになった。

これまでに ActA 欠損株は細胞内でユビキチン化されることが知られている。そこで、MDCK/pGFP-LC3 細胞に WT または $\Delta actA2$ を感染させ、ユビキチンおよび GFP-LC3 陽性菌の割合を経時的に測定したところ、菌体のユビキチン化は LC3 の集積に先立って起こり、感染 2 時間後におけるユビキチンおよび GFP-LC3 陽性菌の割合はともに $\Delta actA2$ では WT と比較して有意に増加した。3-MA 処理下で $\Delta actA2$ を MDCK/pGFP-LC3 細胞に 2 時間感染させた結果、GFP-LC3 陽性菌の割合は著しく低下したが、ユビキチン陽性菌の割合は変わらなかった。さらに、 $atg5^{+/+}$ または $atg5^{-/-}$ MEF 細胞に $\Delta actA2$ を感染させ、ユビキチンおよび内在性の LC3 陽性菌の割合を測定した。その結果、 $atg5^{+/+}$ MEF 細胞においてユビキチンおよび LC3 陽性菌が観察された。一方、 $atg5^{-/-}$ MEF 細胞ではユビキチン陽性菌のみが観察され、その割合は $atg5^{+/+}$ MEF 細胞と同程度であった。これらの結果から、菌体がユビキチン化を受けた後にオートファジーが誘導されることが明らかになった。次に、各種変異 ActA 発現株を用いて菌体のユビキチン化とオートファジーとの関連を調べた。その結果、オートファジー回避性のない $\Delta actA2$ および $\Delta actA21$ は細胞内で高頻度にユビキチン化されたが、オートファジー回避性を示す Arp2/3 複合体および VASP いずれか一方とでも結合可能な変異 ActA を発現する株では菌体のユビキチン化は阻害された。以上の結果から、菌の細胞内運動性とは関係なく ActA が宿主タンパク質を集積させることによ

り、菌体表層のユビキチン化を阻害し、オートファジー認識機構から菌体を保護していることが明らかとなった。

p62 は細胞内に形成された封入体の主要構成成分であり、封入体形成時のユビキチン化タンパク質の凝集に関与する。p62 はユビキチン鎖および LC3 の両者と結合し、オートファジー依存的に分解されることが報告されている。そこで、 $\Delta actA2$ を対象としたオートファジーにおける p62 の関与の可能性を検討した。GFP-LC3 および p62 を恒常的に発現する MDCK 細胞に WT または $\Delta actA2$ を感染させた結果、感染 2 時間後において $\Delta actA2$ のユビキチン陽性および GFP-LC3 陽性菌の割合とともに p62 陽性菌の割合も WT と比べて有意に増加しており、 $\Delta actA2$ の周囲にユビキチン、GFP-LC3 および p62 が共局在している像が観察された。さらに、p62 ノックアウトマウス由来の MEF 細胞を用いて p62 が $\Delta actA2$ に対するオートファジーに必須であるかを調べるため、GFP-LC3 を恒常的に発現する p62 ノックアウト MEF 細胞(p62^{-/-})およびこれに p62 を相補した MEF 細胞(p62^{-/-}/p62)に WT または $\Delta actA2$ を感染させた。その結果、p62 の有無に関わらず $\Delta actA2$ のユビキチン陽性菌の割合には差が認められなかった。一方、GFP-LC3 陽性菌の割合は p62^{-/-}細胞では p62^{-/-}/p62 細胞の半分程度にまで減少した。これらの結果から、宿主タンパク質を集積できない $\Delta actA$ 変異株は感染細胞内において、まず菌体表面がユビキチン化され、そこに p62 が結合し、続いて LC3 が p62 と結合し、最終的に菌はオートファゴソームに捕捉されることを明らかとした。

さらに菌体表層のユビキチン化に対する ActA による防護機能を分子レベルで調べるために、ポリユビキチンおよび p62 陽性の凝集体を形成する易凝集性タンパク質であるポリグルタミンおよび 170* (GCP170 のアミノ酸 566-1375 残基からなる)と ActA (宿主タンパク質集積機能を持つ全長および N 末端もしくはその機能を持たない C 末端)とのキメラタンパク質 GFP-ActA-Q79C および GFP-ActA-170*をそれぞれ作製し、これら易凝集性タンパク質の凝集体形成に対

する ActA による阻害作用の検討を行った。その結果、GFP-ActA-Q79C および GFP-ActA-170*のいずれにおいても、ActA の Arp2/3 複合体および VASP 集積能依存的にポリユビキチンおよび p62 の集積が抑制され、最終的に凝集体の形成が妨げられることを明らかにした。

ActA によるオートファジー阻害作用が非特異的に細胞質成分を分解する恒常性オートファジーおよびラパマイシン誘導性オートファジー、または小胞体およびミトコンドリアを選択的に分解するオートファジーに対して機能するか検討を行った。その結果、いずれのオートファジーにも ActA による抑制効果は見られなかったことから、この抑制効果はリステリアおよび易凝集性のタンパク質において特異的に観察される現象であることが明らかとなった。

以上、本研究の結果から、リステリアは宿主細胞によって凝集体と同様の認識機構によってオートファジーに認識されること、さらに ActA による宿主タンパク質の菌体表面への集積はオートファジー認識回避のためのリステリア特有の偽装戦略であることを明らかにした。