

## 論文内容の要旨

**論文題目** A 群レンサ球菌感染に対するオートファジーの誘導機構解析

**氏名** 野澤 孝志

### 【背景と目的】

生体は病原微生物に対して、上皮や粘膜組織による物理的障壁をはじめ、自然免疫、獲得免疫といった多様な機構により感染防御を行っている。しかし、一部の病原体はこのような免疫系の及ばない細胞質へ侵入し、生体に重篤な疾病を引き起こすことが知られている。近年、当研究室では細胞内侵入性細菌の一種である A 群レンサ球菌に対する防御機構として、それまで細胞内の生理的なタンパク質分解機構として知られていたオートファジー（自食作用）が重要な役割を果たすことを明らかにした。その後、結核菌や赤痢菌、サルモネラ等でも同様の報告がされており、細胞内における新たな免疫システムとして注目されている。

生理的なオートファジーは、誘導シグナルに応答して隔離膜とよばれる膜構造体を形成、その隔離膜が非特異的に細胞質の一部を取り囲み、直径およそ数百 nm の二重膜構造体（オートファゴソーム）となる。次にオートファゴソームの外膜とリソソーム膜との融合によってオートリソソームとなり、内膜とともに内包物が分解される（図 1）。一方の細菌感染によって誘導されるオートファジーも、隔離膜やオートファゴソームなどの基本的なマシナリーは共通しているが、細胞質に侵入してきた細菌を感知しその細菌を特異的に取り囲む点、そしてオートファゴソームの直径は 10  $\mu\text{m}$  以上にも至る点など、異なる点も数多く見られる（図 2）。つまり、細菌感染誘導によるオートファジーには、本システム特有の誘導機構および制御機構が存在すると考えられる。

そこで本研究では、細胞内侵入後、高頻度でオートファジーを誘導し、速やかに分解を受ける A 群レンサ球菌を用いて、細菌感染誘導時特有のオートファジーの誘導制御機構を解明することを目的とした。

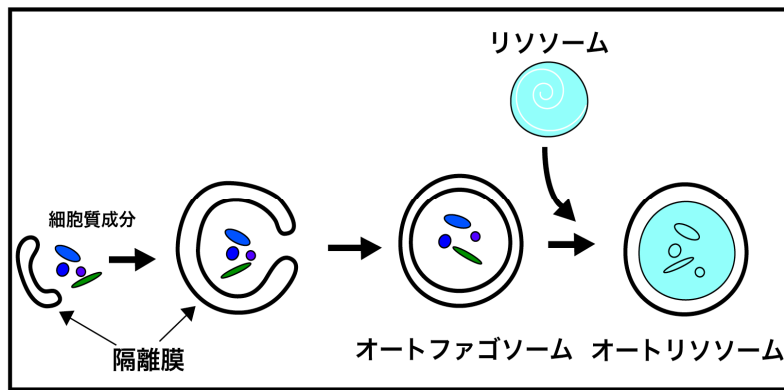


図1 オートファジーの模式図

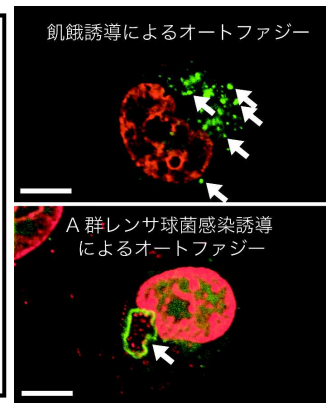


図2 オートファゴソーム写真  
矢印がオートファゴソーム

### 【結果と考察】

#### NLRP4, NLRP10 と相互作用する宿主因子の探索

これまでの研究により, Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptor (NLR) ファミリータンパク質の NLRP4 と NLRP10 が細菌の細胞壁成分の一部を認識し, オートファジーを誘導していることを明らかにした. そこで本研究ではこの NLRP4, NLRP10 に着目し, これらと相互作用する宿主因子を酵母ツーハイブリッドシステムによりスクリーニングすることで, オートファジーの誘導・制御に携わる因子を探索した. NLRP4 と NLRP10 の各ドメインをベイトとし, 酵母ツーハイブリッドシステムを用いてスクリーニングを行った結果, 16 個の候補タンパク質が得られた. これらのタンパク質の EmGFP 融合タンパク質を HeLa 細胞で発現させ, 菌感染時の細胞内局在を観察した結果, 候補タンパク質の一つ, Rho GDP dissociation inhibitor  $\alpha$  (RhoGDI $\alpha$ ) がオートファジーの膜マーカーである LC3 と共局在を示した (図 3).

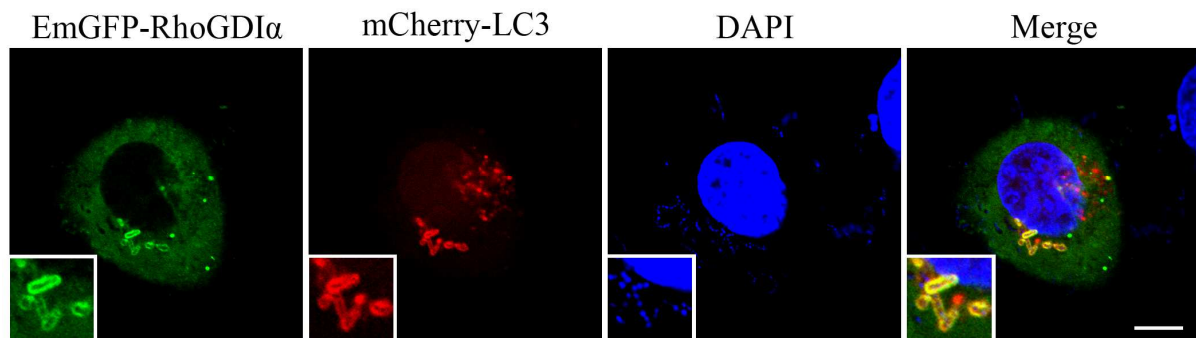


図3 GAS 感染時の RhoGDI $\alpha$  と LC3 の細胞内局在

#### NLRP4 と RhoGDI $\alpha$ の相互作用能の確認

免疫沈降法により, NLRP4 および NLRP10 と RhoGDI $\alpha$  の相互作用が確認された. 次

に, RhoGDI $\alpha$  の相互作用ドメインを決定するため, RhoGDI $\alpha$  の N 末端ドメイン欠損体, C 末端ドメイン欠損体を作製し, 各欠損体と NLRP4 の相互作用を GST pull down アッセイで解析した. この結果, RhoGDI $\alpha$  の C 末端ドメインが NLRP4 と相互作用していること, そしてこの NLRP4 との相互作用が LC3 vacuoles への局在に必須であることが明らかになった. なお, 酵母ツーハイブリットシステムにより得られた RhoGDI $\alpha$  の配列は, C 末端ドメインの一部の配列であったため, この結果とも一致した.

#### RhoGDI $\alpha$ は GAS 感染に対する隔離膜とオートファゴソームに局在する

RhoGDI $\alpha$  が飢餓誘導時のオートファジーにも関与する因子であるのかを試験するため, 飢餓誘導時の細胞内局在を観察した. その結果, 飢餓条件下で形成された LC3 vacuoles には, RhoGDI $\alpha$  は局在しなかった. さらに, 菌に対する LC3 vacuoles への RhoGDI $\alpha$  の局在詳細を解析したところ, RhoGDI $\alpha$  は隔離膜とオートファゴソームに局在するが, オートリソソームには局在しないことが明らかになった. 加えて, RhoGDI $\alpha$  はオートファゴソームがリソソームと融合する前にオートファゴソームから解離していることが示唆された. 以上の結果から, RhoGDI $\alpha$  は A 群レンサ球菌感染誘導時特異的に LC3 vacuoles に局在すること, そして A 群レンサ球菌感染に対する LC3 vacuoles の形成の初期段階で機能している因子であることが示唆された.

#### RhoGDI $\alpha$ により Rho タンパク質が LC3 vacuoles へリクルートされる

RhoGDI $\alpha$  は細胞質中において, RhoA, Rac1, Cdc42 といった様々な Rho タンパク質と結合している. そこで, これら Rho タンパク質も LC3 vacuoles に局在しているのかを観察した. その結果, RhoA と Cdc42 の LC3 vacuoles 局在が認められたが, Rac1 では認められなかった. この RhoA と Cdc42 の LC3 vacuoles への局在率は, RhoGDI $\alpha$  ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べて顕著に減少した. つまり, RhoA, Cdc42 の LC3 vacuoles への局在は RhoGDI $\alpha$  に依存していることが示唆された.

#### RhoA, Cdc42, RhoGDI $\alpha$ のノックダウンにより LC3 vacuoles 形成が遅延する

次に, RhoA, Cdc42 ノックダウン細胞における LC3 vacuoles 形成率を測定したところ, ノックダウン細胞での形成率が感染初期では顕著に減少していたものの, 感染後期ではコントロール細胞と有意な差は見られなくなっていた. つまり, RhoA, Cdc42 のノックダウンにより LC3 vacuoles の形成が遅延したと考えられた. この形成遅延は RhoGDI $\alpha$  ノックダウン細胞でも同程度に見られた.

#### LC3 vacuoles に局在する Rab GTPases

RhoGDI $\alpha$  ノックダウンの LC3 vacuoles サイズへの影響を解析した結果, RhoGDI $\alpha$  ノックダウン細胞では拡大した LC3 vacuoles が見られなかった. A 群レンサ球菌感染時

の LC3 vacuoles 拡大には Rab7 が重要であることが報告されており, RhoGDI $\alpha$  ノックダウン細胞で形成された LC3 vacuoles にも Rab7 の局在は認められた. この結果は, LC3 vacuoles の拡大には Rab7 と RhoGDI $\alpha$  の両因子が関与していることを意味している.

#### RhoGDI $\alpha$ , RhoA, Cdc42 ノックダウン細胞内での GAS の生存率

細胞内に侵入した菌の細胞内生存率を解析した結果, コントロール細胞では感染後 2 時間目から速やかに菌の減少が見られたのに対し, RhoA, Cdc42 ノックダウン細胞では 4 時間目以降に減少が見られ, RhoGDI $\alpha$  ノックダウン細胞では 6 時間目以降に僅かな減少が認められた. この結果から, RhoA, Cdc42 は感染直後のオートファジーによる菌の分解に重要であること, そして RhoGDI $\alpha$  は RhoA, Cdc42 のリクルート以外にも菌分解に機能している可能性が示唆された.

#### A 群レンサ球菌以外の菌に対するオートファジー

*Staphylococcus aureus* や *Salmonella enterica* serovar Typhimurium を感染させた場合にも菌を取り囲む LC3 vacuoles が観察され, この LC3 vacuoles に RhoGDI $\alpha$ , RhoA, Cdc42 の局在が認められた. これは, RhoGDI $\alpha$  による LC3 vacuoles 制御機構が A 群レンサ球菌感染時特異的なものではなく, 他の細菌感染に対するオートファジーにも共通した機構であることを示唆していると考えられる.

本研究の結果から, 細胞内のセンサータンパク質である NLRP4, NLRP10 が様々な Rho タンパク質と結合する RhoGDI $\alpha$  と相互作用することで, RhoA や Cdc42 を LC3 vacuoles へリクルートしていることが明らかとなった. そしてリクルートされた RhoA, Cdc42 は, 感染初期において LC3 vacuoles 形成を迅速に行うために重要な因子であることが示唆された. A 群レンサ球菌に対する LC3 vacuoles の直径は最大で飢餓誘導時の 10 倍以上であり, 必要となる膜成分はおよそ 100 倍以上にもなる. 巨大な膜構造体を形成するためには迅速な膜成分の供給が重要であると考えられる. Rho ファミリータンパク質が制御する細胞骨格は小胞輸送の分子基盤であることから, RhoA や Cdc42 は細菌感染時特異的な LC3 vacuoles の膜成分供給を担っているのかもしれない.