

Rab GTPase ネットワークによるゼノファジー制御機構解析

京都大学 大学院医学研究科 微生物感染症学分野 准教授
野澤 孝志

研究内容及び成果

細胞質内へ侵入した病原細菌に対して、宿主はオートファジー経路により菌を選択的にリソソームへ運び殺菌する。この病原体を標的としたオートファジー（ゼノファジー）は、細菌による膜傷害の感知やオートファゴソーム形成、リソソーム融合などの複雑な膜輸送イベントを介した分解経路である。我々は細胞内膜輸送の制御を司る Rab GTPase に着目し、感染ステージに応じた Rab の活性化と下流シグナルを明らかにすることで、ゼノファジーに特有の分子機序を明らかにすることを目的とした。今回、網羅的な Rab タンパク質のノックダウンスクリーニングにより、ゼノファジーに関与する Rab を新たに 5 つ (Rab8A, 10, 19, 41, 44) 同定した。これらの Rab の機能解析の結果、オートファゴソーム形成過程に Rab10 と Rab19 が、リソソーム融合には Rab19 が、そしてオートファゴソーム内の酸性維持に Rab8A と Rab41 が関与することが示唆された。さらに、共沈タンパク質の質量分析や相互作用データベース解析を行った結果、Rab19 は HOPS 複合体と相互作用して膜融合を制御することでオートファゴソームの伸長やリソソーム融合を調節すること、Rab8A は TFRC と結合してこれをオートファゴソームへリクルートすることで、オートファゴソームが菌によって損傷を受けた際の膜修復分子 (ESCRT-III 複合体) の局在化を促進することが明らかとなった。また、Rab41 のノックダウン細胞では、ESCRT-III 複合体がオートファゴソームへ蓄積し、ESCRT-III の解離に関わる VPS4 の局在化が阻害されていた。そこで、Rab41 と ESCRT 関連タンパク質との網羅的な相互作用因子探索を行った結果、Rab41 は VPS36 と VPS4 と相互作用することが明らかとなった。VPS36 のノックダウンにより Rab41 と VPS4 の局在化が抑制されたことから、VPS36-Rab41-VPS4 axis により ESCRT による膜修復が制御されていることが示唆された。次に、こうしたオートファゴソームに損傷を与える細菌側の因子について解析を行った。A 群レンサ球菌は膜孔形成毒素 (ストレプトリジン O, SLO) を分泌することで宿主の膜に膜孔を形成する。そこで、細胞質で SLO を阻害するため、SLO に対する細胞内抗体 (SLO intrabody) を作成した。SLO intrabody 発現による菌の侵入、オートファゴソームの形成への影響は認められなかったが、オートファゴソーム内の pH の低下と ESCRT 複合体の局在化減少が認められた。さらに、SLO intrabody 発現細胞では、コントロール細胞よりも菌が速やかに減少した。これらの結果から、A 群レンサ球菌は膜孔形成毒素を分泌することでオートファゴソーム膜にダメージを与え、酸性化を抑えることで細胞内での生存・増殖を促進することが示唆された。一方で、ESCRT により

ダメージを受けた膜を修復することで殺菌経路を維持していることが示された。今回明らかになったオートファゴソームの膜修復経路は新規に観察された現象であり、ゼノファジー特有の機構である可能性が高いと考えられる。

今後の研究の見通し

今回、Rab タンパク質の網羅的解析から、Rab8A と Rab41 の機能解析の結果、感染防御システムとしてのオートファジー（ゼノファジー）に膜修復経路が関与していることが明らかになった。新規制御 Rab タンパク質 5 つの内、4 つについては機能が明らかになったが、残りの Rab45 の機能については未だ不明のままである。今後、Rab45 の機能解析を進めて行くことで、明らかになっていない新規の細胞内システムがゼノファジーに関わっていることがわかるかもしれない。また、病原性細菌の多くは様々な戦略によりゼノファジーから回避している。こうした細菌による免疫制御機構を明らかにすることで、新たな制御分子、制御機構の発見が期待できる。