

「細菌糖鎖認識のニューパラダイム:非定型ユビキチン化によるゼノファジー制御の解明」

京都大学 大学院医学研究科 微生物感染症学分野 教授

中川 一路

要旨

宿主細胞内に侵入した微生物は、細胞自立性免疫 (Cell autonomous immunity) の 1 つであるゼノファジー (Xenophagy) によって排除されることが明らかとされている。我々は、A 群レンサ球菌をモデルとしてこのメカニズムの全貌の解明を試みている。オートファジーは、元々は「非選択的」な細胞内のバルクな分解システムであるが、その誘導様式は様々である。その 1 つのキーとなるのがそれぞれ構造の異なる病原体をどのように認識しているのかという機構が多岐に渡っていることである。この病原体の認識については宿主細胞内で菌の何らかの構造がユビキチン(Ub)化されることが重要であるが、その Ub 化については、E3 ligase が病原体の何らかの構造体を認識することで、E2 によって Ub 化される **degron motif** が有力視されている。しかし、E3 ligase そのものは数百種類あることから、どのような菌種を認識しうるのかはほとんど解明されていない。また、菌が細胞内に侵入する過程では、細胞内の小胞を介した膜動態の実態も明らかとする必要がある。そこで、本研究では、A 群レンサ球菌が細胞内に侵入する過程を、小胞輸送を介して菌の輸送を時空間的に制御する RabGTPase の動態をあわせて解析することで、細胞内での菌体および菌体成分の Ub 化に関わる因子についての解析を行った。その結果、①グラム陽性菌である A 群レンサ球菌の最表層にある多糖抗原を認識する Ub リガーゼの同定 ②A 群レンサ球菌が産生する膜孔形成毒素であるストレプトリシン O (SLO)によって障害されるゼノファジー膜の修復機構を制御する因子の同定 ③ A 群レンサ球菌の細胞内での分解を識別・制御する因子の同定 ④A 群レンサ球菌によって産生される膜孔形成毒素である SLO に対する Ub キナーゼの同定とゼノファジーの制御機構の 4 点を明らかとすることができた。

背景・目的

宿主細胞内に侵入した病原体は、細胞内で増殖した後、隣接した細胞や組織深部、血中へと感染を拡大させ、様々な病原毒素により免疫を回避し、病原性を発揮する。細胞への付着や侵入メカニズム、そして組織深部における病原性発揮機構は病原体により様々であるが、宿主細胞内での増殖は病原体（特にウイルス）の感染拡大にとって共通して必須である。そしてこうした「細胞内」の微生物に対する宿主細胞の新たな自然免疫として、「オートファジー」が機能していることを明らかにした¹。

病原体をターゲットとしたオートファジーを特に「ゼノファジー」と呼び、これまでに、様々な病原性細菌、ウイルス、寄生虫に対して排除機能を有することが証明されてきたが、一方で、結核菌や高病原性ウイルスなどの細胞内生存に特化した微生物は分解から回避していること、また一部の病原体はゼノファジーを利用して増殖することが明らかになってきた²。すなわち、ゼノファジーによる殺菌機構と細菌による回避機構を理解することは、細胞内侵入性の病原細菌の病原性を理解する上で重要なポイントと言える。

ゼノファジーにおいて最も重要なポイントは、オートファゴソームにより非自己である病原体を選択的に捉えることであり、この選択性（認識）は、病原体のユビキチン標識によって担われている。細胞質中に侵入した細菌は、K48/K63 結合型の典型的なユビキチン鎖でコーティングされ、そこにユビキチン結合性のアダプタータンパク質、オートファゴソーム膜上の LC3 タンパク質が図 1 のように架橋されることで、選択的に膜で囲われる。数年前までは菌体表面に残存したエンドソーム膜成分がユビキチン化されると考えられてきたが、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) が直接ユビキチン化されること、そしてこの LPS のユビキチン化がゼノファジー誘導に必須であることが報告され、ゼノファジーは病原体を直接ユビキチン化していることが明らかとなった (Otten et al., Nature, 2021)。LPS ユビキチン化を担うユビキチンリガーゼ RNF213 は菌の周囲ヘリクルートされるが、RNF213 は LPS に結合する訳ではないことから、どのように菌を識別して標的としているのか、時空間的な制御機構については明らかになっていない。我々も近年、グラム陽性菌である A 群レンサ球菌のユビキチン化機構の解析を進め、菌体表層の糖鎖成分がユビキチン化とゼノファジー誘導に重要であることを明らかにし、さらに菌体表層のレンサ球菌族表層特異的糖鎖ナラムノース側鎖構造を認識するユビキチンリガーゼ複合体 (SCF-FBXO2) を同定することに成功した (図 1)。さらにこの研究過程において、K48/K63 結合型以外の、機能がほとんど明らかになっていない非定型型ユビキチン鎖が病原体認識に関与している可能性を見出している (図 2)。

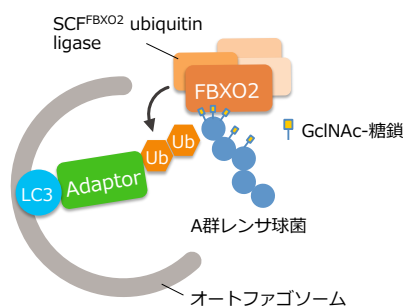


図1 ユビキチン化を介した細菌認識

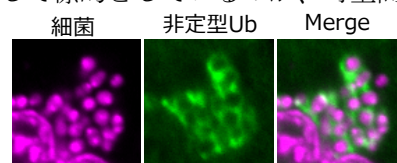


図2 非定型型ユビキチン局在

また一方で、近年、細胞内増殖能の高い A 群レンサ球菌株 (M89-clade-3 株) が世界的に流行しているが、その遺伝子的要因や細胞内動態は不明のままである。我々は予備解析において、通常ゼノファジーにより効率的に分解される菌株を細胞に感染させ、その際に細胞内で生存していた一部のクローンを再培養して再感染させると、細胞内で効率的に増殖することを確認している (図 3)。本菌の細胞内増殖性には、オートファジー回避が必須であることから、細胞内進化している可能性が高い。

これらの予備的データをもとに、感染時における内在性のユビキチンリガーゼや鎖特異的ユビキチン鎖の細胞内挙動を可視化し、(タンパク質以外の分子を含めた) 細菌成分のユビキチン化制御機構を解析することで、ゼノファジーにおける細菌認識メカニズムの解明、さらには、病原性細菌によるゼノファジーからの回避機構を明らかにできる可能性が高く、その解明を試みた。

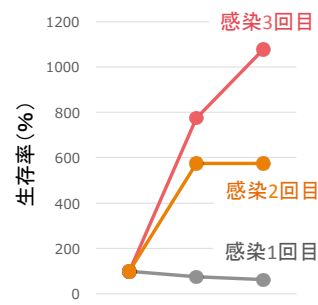


図3 再感染実験による細胞内増殖

方法

I) 内在性ユビキチン化関連タンパク質の可視化技術の構築

これまでのユビキチン化研究の多くは、細胞を破碎してまとめて解析する生化学的な解析や、GFP に代表される蛍光タンパク質を目的の生体分子に遺伝子的に融合し細胞内で発現させることで細胞内局在や動態を解析していたが、元々細胞が持つ「内在性」のタンパク質の本来の感染時の挙動を見落としている可能性、また本来とは異なる可能性が示唆されている。そこで本研究では、小分子プローブを用いた天然タンパク質の化学修飾やゲノム編集技術を用いた内在性タンパク質の標識により内在性ユビキチン化関連タンパク質のイメージングを行う。

II) 非定型型ユビキチン鎖による細菌認識の機能解析

I)で構築した技術を用いて、FBXO2 や非定型型ユビキチン鎖の A 群レンサ球菌へのリクルートを指

標に、ユビキチン化因子の siRNA ライブラリー等を用いてスクリーニングする。得られた候補分子についても、D)の内在性標識やノックアウト細胞、ノックアウトマウスを作成し、菌のユビキチン化やゼノファジー誘導、感染制御への関与を検証する。

III) (タンパク質以外の分子を含めた) 細菌成分のユビキチン化制御機構解析

感染細胞から精製した細菌と鎖特異的なユビキチン化抗体により、ユビキチン化を検出する。各種ノックアウト細胞や、表層糖鎖の合成遺伝子の各種変異株、表層タンパク質の遺伝子欠損変異株（全て作成済み）を用いることで、ユビキチン化部位とそのユビキチン結合タイプを決定する。

IV) 実験的進化実験によるユビキチン化回避メカニズムの解析

ヒト培養細胞への感染と、生存細菌の回収を繰り返すことで、細胞内増殖性が上昇した変異株をライブラリー化し、そのライブラリーを Tn-Seq により遺伝子変異や失活した遺伝子を明らかにする。また同時に、RNA-Seq を用いて遺伝子発現をプロファイル化する。これらの情報を統合して、高病原性化の原因因子候補を決定し、さらに、それらの遺伝子産物の機能解析、特に詳細な宿主細胞内解析や実験動物での病原性の変化を詳細に解析することで、高病原性を獲得した過程をゲノムの変化・遺伝子発現の変化から明らかにする。

結果

① グラム陽性菌である A 群レンサ球菌の最表層にある多糖抗原を認識する Ub リガーゼの同定³
本研究で用いている A 群レンサ球菌の最表層には、それぞれの菌体が産生する独自の糖鎖構造物に覆われており、A 群レンサ球菌につ

いては群多糖抗原と呼ばれている多糖体で覆われており、この糖は菌体高成分の 30%を占める。そこで、A 群レンサ球菌の菌体の最表層に存在する多糖抗原合成遺伝子である *gacA-L* 遺伝子について、各遺伝子の遺伝子破壊株を作成し、それらの菌でのゼノファジーに対する応答性を確認したところ、多糖

抗原の側鎖合成に関わると考えられる *gacI-L* の遺伝子破壊株では著名にオートファジーへの認識が減少した。この細胞内認識に関わる生体内分子のスクリーニングを開始し、宿主細胞内に存在する複数種の糖鎖認識に関わるユビキチンリガーゼの可能性を考えた。そのうち、FBXO2 遺伝子が、菌体表層糖鎖の認識に関わっていることが明らかとなった（図 4）。FBXO2 タンパクは、in vitro の再構成実験からその C 末端の糖鎖結合モチーフと考えられる Y279 および W280 によって認識されることが明

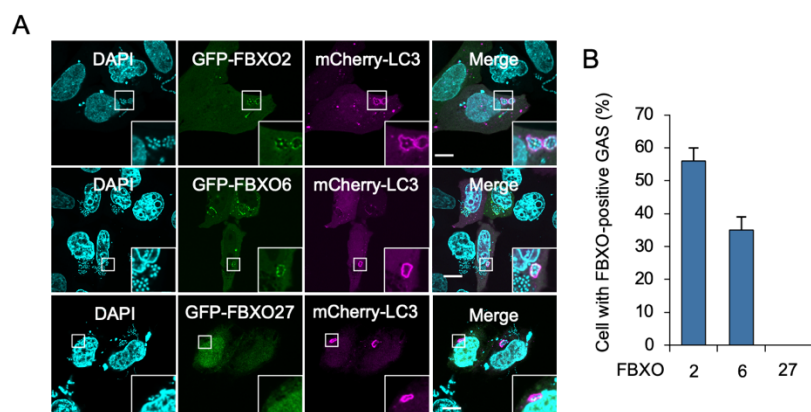


図 4 FBXO ファミリーのオートファゴソームへの局在の確認 A: 共焦点レーザー顕微鏡による共局在解析 B: 細胞内に侵入した A 群レンサ球菌との局在率

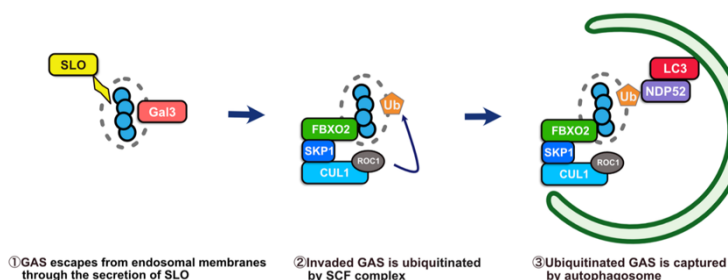


図 5 宿主細胞内での A 群レンサ球菌特異的なゼノファジー誘導機構における糖鎖認識レセプターである FBXO2 の役割

らかとなった。すなわち、細胞内に侵入した A 群レンサ球菌は、菌種特異的な菌体表層の糖鎖の側鎖である GlcNAc が、宿主細胞内の Danger Signal を検知する FBXO2 によって認識され、この FBXO2 そのものが E3 ligase として機能することで菌種特異性を担保しゼノファジー誘導を行っていることが明らかとなった (図 5)。

② A 群レンサ球菌が産生する膜孔形成毒素であるストレプトリシン O (SLO)によって障害されるゼノファジー膜の修復機構を制御する因子の同定

本研究で用いている A 群レンサ球菌は、エンドソーム膜を破壊して細胞質内に脱出するために、膜孔形成毒素である Streptolysin O (SLO)を用いてエンドソーム膜を破壊する。この動態を詳細に解析している過程で、菌を捉えたゼノファゴソーム酸性化されていない小胞が一部存在し、またゼノファゴソーム膜であるにも関わらずユビキチン化されているものも観察された。このことから、一部の菌はゼノファゴリソソームからも脱出して増殖している可能性が示唆された。そこで、細胞内トラフィッキングのキーとなる Rab 分子の網羅的なノックダウン系を用いてスクリーニングを行い、Rab8A, Rab19, Rab41, Rab44 の 4 種が候補として選択された (図 6)。

さらにこのゼノファゴリソソームに局在する分子を検討したところ、エンドソーム膜の修復に関わる ESCRT を構成する分子である CHMP4B が局在していることが明らかとなった。これまでオートファゴソーム膜の修復には ESCRT が関与しているという報告はなく、細菌感染にともった現象である可能性が高い。そこで、ゼノファゴリソソーム膜の障害を引き起こしている細菌性因子の探索を開始したが、最も可能性の高い SLO の欠失変異体では菌がエンドソームから脱出できないために解析が困難であった。そこで、SLO に対して作製した sc-Fv (単分子抗体) を細胞質内に発現させて、感染実験を行ったところ、ゼノファゴリソソーム膜への ESCRT の局在が抑制された。すなわち、エンドソーム膜と同様に、ゼノファゴリソソーム膜の障害も SLO によって引き起こされることが明らかとなった。これらの結果から、エンドソーム膜の障害の修復に用いられる ESCRT は Rab41 非依存的に膜修復を行うが、細菌毒素によってダメージを受けたゼノファゴリソソーム膜は Rab41 依存的に ESCRT を局在させゼノファゴリソソーム膜の修復を行っていることが明らかとした。すなわち、細胞自律性免疫として機能しているゼノファジーは、通常は用いられない機能を動員して細胞内の細菌

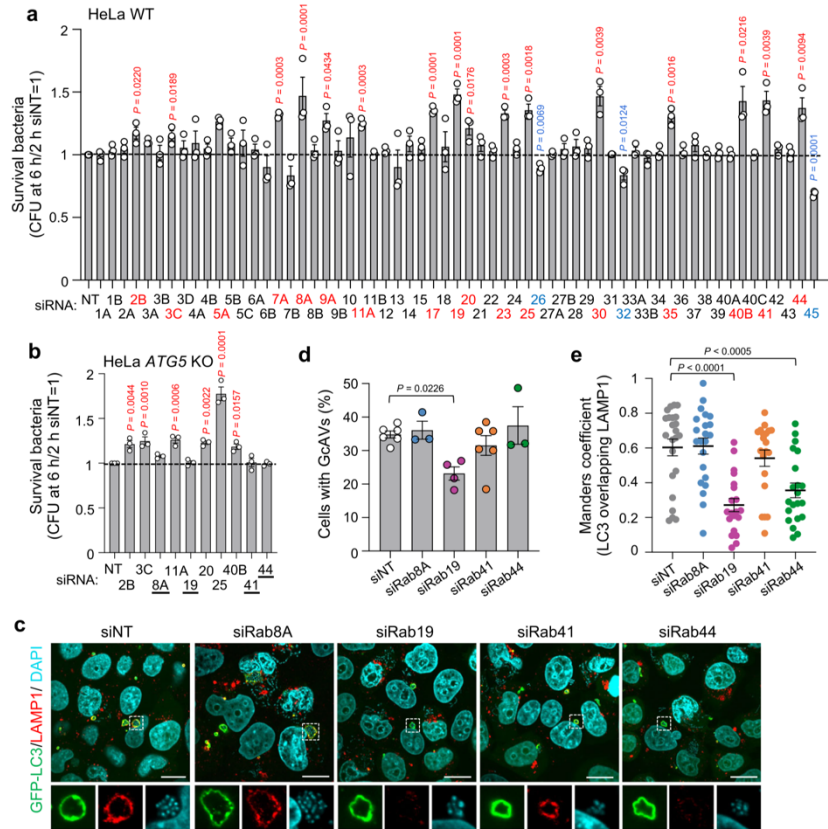


図 6 ゼノファゴリソソーム膜の修復に関わる Rab 分子のスクリーニング a: Rab の網羅的なノックダウン系による細胞内菌数を指標としたスクリーニング b: オートファジー不全細胞での細胞内菌数の確認 c: 候補となった Rab のノックダウンによるゼノファジー膜の状態

を効率的に除去していることが明らかとなった。

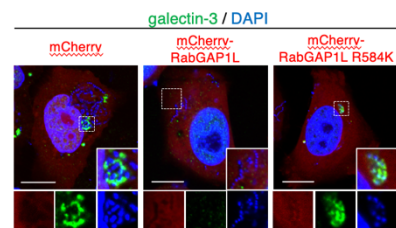
③ A 群レンサ球菌の細胞内での分解を識別・制御する因子の同定

A 群レンサ球菌は、宿主細胞内にエンドサイトーシス経路で侵入してゼノファジーによって分解されるが、その細胞内での挙動は上記②で示した Rab GTPase によって制御されている。Rab GTPase の制御には、Rab の活性化に関わる Rab GEF と Rab の不活性化に関わる Rab GAP がある。そこで、Rab GAP の網羅的な過剰発現系を用いたスクリーニングによって Rab GTPase の制御系の解析を試みた。その結果、TBC1D18 (RabGAP-1L)の過剰発現で、ゼノファジーの誘導が著しく抑制されることが明らかとなった。この Rab-GAP1L の過剰発現体発現細胞では、障害された膜マーカーである Galectin3 はほとんど誘導されず、Rab-GAP1L の不活性化変異体あるいは KO 細胞では通常の細胞と変化が認められなかった。さらにリサイクリングエンドソームマーカーである Rab11A の局在を確認したところ、Galectin3 陽性の小胞とは全く逆に、Rab11A 陽性の小胞が著しく増加していた (図 7)。これらの結果から、Rab-GAP1L はエンドサイトーシス経路で侵入した A 群レンサ球菌が初期エンドソームから後期エンドソームを経由してゼノファジー誘導に至るために、初期エンドソームからリサイクリングエンドソームから菌体が排出されるのを抑制している因子であることが示された。

④ A 群レンサ球菌によって産生される膜孔形成毒素である SLO に対する Ub キナーゼの同定とゼノファジーの制御機構

細胞内の細菌に対するゼノファジー誘導を導く菌体構造物の Ub 化についての知見は集まりつつあるものの、菌体が産生する分泌毒素等に対しては未知であった。そこで、Ub Ligase に対する認識部位について degron motif について情報学的な解析を行った。その結果、A 群レンサ球菌のエンドソーム脱出の鍵となる SLO に複数の degron motif が見出された。特に、SLO の C 末端に存在する膜貫通領域に存在する PFSTVIP の配列が、Ub Ligase である SIAH の認識部位である PxSxVxP モチーフと合致することから、SIAH の変異体および SLO の点変異体等を作製して解析を行った。その結果、免疫沈降実験から SIAH と SLO が直接結合している可能性が高いこと、PLA アッセイによって in vivo での結合も認められた。さらに SIAH にはホモログである SIAH1 と SIAH2 が存在するが、SIAH1 のみが菌体周辺に集積していた。SIAH1 のノックダウン細胞ではゼノファジー誘導が抑制されるだけでなく、リソソームとの融合が低下していることも明らかとなった。これらの結果から、細胞内に侵入した A 群レンサ球菌は、菌体のみが Ub 化されるのではなく、菌の分泌する毒素についても Ub 化することで、感染防御を行っていることが明らかとなった。

Galectin-3: Damaged endosome marker



Rab11A: Recycling endosome marker

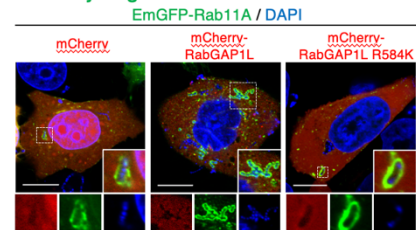


図 7 Rab-GAP1L の過剰発現体・不活性化変異体による galectin3 と Rab11A の動態

考察

本研究においては、細胞のもつ細胞自律性免疫の一端としてゼノファジー誘導と Ub 化に焦点をあてて、①グラム陽性菌である A 群レンサ球菌の最表層にある多糖抗原を認識する Ub リガーゼの同定 ②A 群

レンサ球菌が産生する膜孔形成毒素であるストレプトリシン O (SLO)によって障害されるゼノファジー膜の修復機構を制御する因子の同定 ③ A 群レンサ球菌の細胞内での分解を識別・制御する因子の同定 ④A 群レンサ球菌によって産生される膜孔形成毒素である SLO に対する Ub キナーゼの同定とゼノファジーの制御機構の 4 点について解析を行った。これまで、細胞内に侵入する細菌についての Ub 化については Ub Ligase の関与は示されたものの、その基質については明らかとされていなかった。本研究では、A 群レンサ球菌の菌体の最表層に存在する多糖抗原のラムノース側鎖を認識する FBXO2 を同定することができた。さらに、オートファゴソームの特徴的な構造で二重膜構造体が障害されているのかどうかというのが長年未解明であったが、SLO によって二重膜も障害されているが、速やかに修復されて菌の分解を行っているという知見が得られた。さらに、細胞内に侵入した細菌がリサイクリングエンドソームを介して脱出する経路についても、Rab-GAP1L を介して制御していることも明らかとできた。これらは、細菌が細胞内に侵入して、細胞質に脱出する菌であっても可能な限り細胞の機能を動員して菌を分解排除する機構が備わっていることを意味している。さらに、宿主細胞内に送り込まれる細菌の分泌物は一般的にはエフェクターと呼ばれているが、その処理等については全く明らかとなっていなかった。本研究によって、細菌毒素も Ub 化されて処理されていることが明らかとなった。細菌の産生する分泌タンパク質は多岐に渡っており、すべてが Ub 化されているのかについては今後の研究が必要であるが、本研究によって少なくとも A 群レンサ球菌の感染では SLO というエンドソーム膜障害に必須の毒素も細胞内で処理されうること示しており、細胞自律性免疫は予想されている以上に複雑な機構を備えていることが示唆された。

共同研究者

野澤孝志（京都大学大学院医学研究科・准教授）、村瀬一典（京都大学大学院医学研究科・助教）、津本浩平（東京大学大学院工学系研究科・医科学研究所・教授）中木戸誠（東京大学大学院工学系研究科・講師）

引用論文

1. Nakagawa I, et al., Autophagy Defends Cells Against Invading Group A *Streptococcus*. *Science*, 306, 2004.
2. Deretic, V., Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism. *Immunity*, 54, 2021.

助成研究に関連した発表論文

3. Yamada A, et al. FBXO2/SCF ubiquitin ligase complex directs xenophagy through recognizing bacterial surface glycan. *EMBO Rep* e52584, (2021)
4. Nozawa, T. et al. Rab41-mediated ESCRT machinery repairs membrane rupture by a bacterial toxin in xenophagy. *Nature Commun.* 14: 6230 (2023)
5. Minowa-Nozawa A., et al. RabGAP1L Modulates Rab7A and Rab10 to orchestrate cell-autonomous immunity. *Cell Rep.* in press.