

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成14年度採択研究代表者

吉森 保

(情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 細胞遺伝研究系 教授)

「たんぱく質と膜が造る細胞内物流システム」

1. 研究実施の概要

真核細胞内部では種々の膜オルガネラ間を分子が往来し、物流のネットワークが形作られている。分子のやり取りは、たんぱく質に制御されたダイナミックな膜の動きを介したメンブレントラフィックと呼ばれる輸送機構によって行われる。このシステムは高等生物において特に発達し、多細胞社会の運営に欠かせない種々の機能を担っており、その破綻は様々な疾患の原因となる。本研究は、未知の部分の多い物流経路エンドソーム系とオートファジーに焦点を絞り、その分子メカニズムの解明と高次生体機能と疾患における役割の究明を目指すものである。

平成16年度は本プロジェクト実施が早くも実を結び、オートファジーの予想外の新機能を複数報告するなど目標を上回る成果を得た。まず、細胞内に侵入した病原性細菌のA群レンサ球菌をオートファジーが殺すことを見いだした (Science誌に発表)。これは本来細胞内代謝に関わるオートファジーを、細胞が効果的に生体防御に活用していることを示すもので、新たな自然免疫機構の発見を意味する。さらには、東大・笹川千尋教授らとの共同研究で、赤痢菌がこのオートファジーによる攻撃を回避するメカニズムを持つことを明らかにした (Science誌に発表)。また、マウス新生児が胎盤から切り離されたことで一時的に深刻な栄養飢餓に陥り、その克服にオートファジーが必要であることを、遺伝子破壊マウスを用いて示した (Nature誌に発表。東京都臨床研・水島昇室長らとの共同研究)。オートファジー並びにエンドソーム系の分子基盤についても解析が進んでおり、今後はそれをさらに推し進めると共に、新たに発見された機能について医学的応用も視野に入れた研究展開を図りたい。

2. 研究実施内容

[エンドソーム系] エンドソームは、細胞外から取り込んだ分子を選別し、細胞膜、リソソーム、ゴルジ体という異なる目的地に向け発送する機能を持つ。この選別は、細胞の増殖制御等種々の重要な過程に必須である。また種々の病原体がエンドソームを通して細胞内に侵入する。エンドソーム機能の分子機構及び病原体侵入のメカニズムを明らかにし、発癌や感染症等エンドソームが関わる疾患の発症機序を探ることを目的とする。平成16

年度は、以下の研究を実施した。

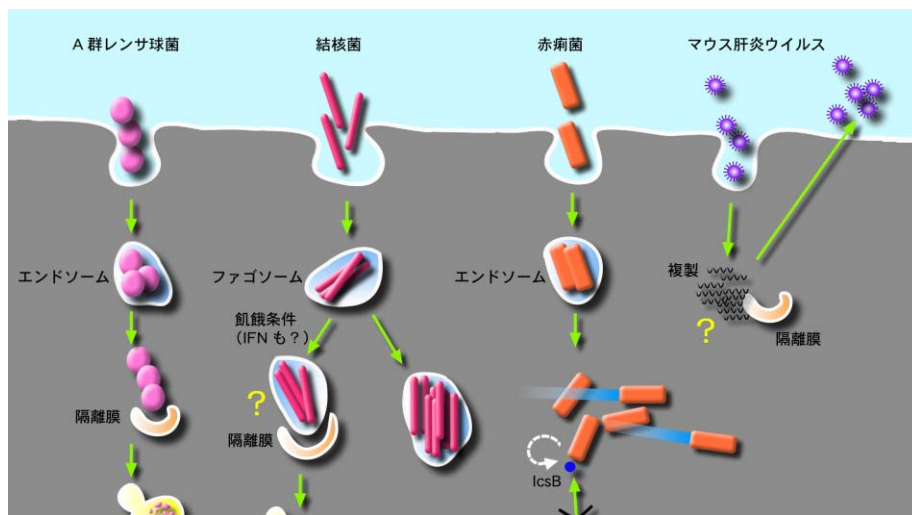
1) Cbl1: エンドソームにおけるリソソームへの選別のシグナルは、ユビキチン化である。EGF受容体などをユビキチン化するリガーゼCbl1が、EGF刺激に応じてエンドソームの特定箇所に着在化すること、受容体がリソソームへ輸送されると細胞質に戻ることを見いだした。(吉森グループ)

2) エンドソーム機能に関わる可能性のあるTom1タンパク質とそのホモログが、エンドソームの特定箇所に着在化することと、ある細胞骨格関連タンパク質と結合することを見いだした。(吉森グループ)

3) 人類史上最も患者数の多い慢性疾患である歯周病の原因菌*P. gingivalis*の細胞内侵入機構を解析するために、本菌の表層成分を固着したビーズの細胞内取り込みアッセイ系を確立した。取り込みが、微小管、アクチン系、コレステロール、ダイナミンなどに依存することを発見した。(吉森グループ&天野グループ)

[オートファジー] オートファジーは、オートファゴソームと呼ばれる膜構造が、細胞質の一部を取り込み、リソソームと融合することでそれを消化するシステムである。細胞成分の代謝回転や飢餓時の栄養源確保が基本的な役割であるが、発生・分化や様々な疾患とも密接に関係すると考えられている。本プロジェクトでは不明の点が多いその分子機構や生理的病理的意義の解明を目指している。平成16年度は、オートファジーの新機能を報告する等多くの成果を得た。

1) 感染症: A群レンサ球菌は、咽頭炎などの原因となるごくありふれた病原性細菌である



現在判明している病原体とオートファジーの関係

A群レンサ球菌が細胞質に侵入すると、オートファジーが誘導され菌が捕獲分解される。結核菌は、通常食細胞のファゴソーム(エンドソーム類似オルガネラ)内に留まり増殖するが、飢餓条件ではオートファジーによる分解を受ける。赤痢菌は細胞質に出ても、IcsBを分泌してオートファジー機構による認識を攪乱するので分解を受けず増殖する。マウス肝炎ウイルスは、オートファジーを「ハイジャック」して自己遺伝子の複製を行い細胞外に出ていく。A群レンサ球菌、赤痢菌、マウス肝炎ウイルスのモデルは我々と共同研究者の研究成果に基づく。

るが、時として、高死亡率の劇症感染症を引き起こす。我々は、この菌が非食系細胞に侵入すると、侵入したほとんどの菌がオートファジーによって捕獲・分解されることを見いだした(文献7)。オートファゴソーム形成に必須のATG5遺伝子を破壊した細胞では、

菌は増殖し細胞外に再び出て感染が拡大する。オートファジーが代謝に留まらない自然免疫としての機能を果たしていることが判明した。通常のオートファジーが非選択的であるのと異なり、菌の侵入を感知し菌を特異的に捕獲する点が注目される。また通常の10倍以上のサイズのオートファゴソームが形成されることも特徴的で、現在、菌捕獲オートファジーに特有の分子メカニズムの解析を進めている。

さらに我々は、東大医科研・笹川千尋教授らとの共同研究により、赤痢菌はこのオートファジーによる捕獲を逃れる機構を持つことを示した（文献8）。すなわち、赤痢菌の表面タンパク質VirGにAtg5が結合するとオートファジーによる菌の捕獲が起こるが、赤痢菌の分泌タンパク質IcsBがそれを競合的に阻止していた。この機構を持つため赤痢菌は、腸管上皮細胞内で増殖し細胞間を伝播することが可能となる。

これらの結果から今後、難治性疾患の原因となる薬剤耐性菌や細胞内寄生細菌に対する予防治療開発にオートファジー研究が役立つ可能性が出てきた。また、マウス肝炎ウイルスがオートファジーを逆に利用して細胞内で増殖していることが判明し（文献2：Venderbit大・Mark R. Denison教授らとの共同研究）、宿主細胞と病原体の進化上での攻防の一端が垣間見えてきた。（吉森グループ&天野グループ）

2) 新生児飢餓：我々は、先に開発した、オートファゴソームのマーカータンパク質LC3にGFPを繋いだものを発現するトランスジェニックマウス（文献1）を用いて、新生児が胎盤からの離脱によって一過性ながら深刻な飢餓状態に陥り、それに対応してオートファジーが全身で亢進することを見いだした（文献6：東京都臨床研・水島昇室長らとの共同研究）。今回作成した*ATG5*遺伝子破壊マウスはこの飢餓を乗り越えられず、生後一日で死亡する。哺乳動物においてオートファジーが生存に必要であることを初めて示した。（吉森グループ）

3) フォールディング病：小胞体内で凝集し肝変性を引き起こす α_1 アンチトリプシンZ変異体の分解にオートファジーが関わることを既に見いだしていたが、実際にオートファゴソームが本タンパク質を包み込む様子を捉えることに成功した（論文投稿中）。（吉森グループ）

4) LC3がフォスファチジルエタノールアミンと共有結合することでオートファゴソームに局在化している証拠を得た。LC3のホモログGABARAPとGATE16も、オートファゴソームに結合することを示した（文献3）。（吉森グループ）

5) 形成されたオートファゴソームの移動とリソソームとの融合を高感度イメージングで経時的に観察することに成功した。移動の分子メカニズムの解析も行った。（吉森グループ）

3. 研究実施体制

吉森グループ

- ① 研究分担グループ長：吉森 保（情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所、教授）
- ② 研究項目：
 - 1) エンドソーム系の分子機構と生理機能の解析
 - 2) オートファジーの分子機構と生理機能の解析

天野グループ

- ① 研究分担グループ長：天野 敦雄（大阪大学大学院歯学研究科、教授）
- ② 研究項目：
 - 1) 歯周病菌の細胞内侵入機構の解析と予防療法開発を目指した研究の展開
 - 2) オートファジーによるA群レンサ球菌その他の病原体の分解機構の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

吉森 保

- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y.
In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker
Mol. Biol. Cell **15**, 1101-1111 (2004)
- Prentice E W, Jerome G, Yoshimori T, Mizushima N, Denison M R.
Coronavirus Replication Complex Formation Utilizes Components of Cellular Autophagy
J. Biol. Chem. **279**, 10136-10141(2004)
- Kabeya Y, Mizushima N, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T.
LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation.
J. Cell Sci. **117**, 2805-2812 (2004)
- Fujita H, Umezaki Y, Imamura K, Ishikawa D, Uchimura S, Nara A, Yoshimori T, Hayashizaki Y, Kawai J, Ishidoh K, Tanaka Y, Himeno M.
Mammalian class E Vps proteins, SBP1 and mVps2/CHMP2A, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4B
J. Cell Sci. **117**, 2997-3009 (2004)
- Birkeland H C G, Simonsen A, Gillooly D J, Mizushima N, Kuma A, Yoshimori T, Slagsvold T, Brech A, Stenmark H
Alfy, a novel FYVE domain-containing protein associated with protein

granules and autophagic membranes

J. Cell. Sci. 117, 4239-4251 (2004)

- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N
Role of autophagy during the early neonatal starvation period
Nature 432, 1032- 1036 (2004)
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T
Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*
Science 306, 1037-1040 (2004)
- Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C
Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy
Science 307, 727-731 (2005) (published online 2 December, 2004)
- Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G
Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis
Mol. Cell. Biol. 25, 1025-1040 (2005)
- Yamada T, Carson A R, Caniggia I, Umehayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K, Scherer S W
Endothelial nitric oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast
J. Biol. Chem. Mar 2005; 10.1074/jbc.M413957200.

天野 敦雄

- Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I, Yamamura T, Kuboniwa M, Nakayama K, Hamada S, Amano A
Porphyromonas gingivalis induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through activator protein 1 pathway
Infect. Immun. 72, 1706-1714 (2004)
- Kuboniwa M, Amano A, Kimura K. R, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S
Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes
Oral Microbiol. Immunol. 19, 168-176 (2004)
- Nakano K, Kuboniwa M, Nakagawa I, Yamamura T, Nomura R, Okahashi N, Ooshima T, Amano A
Comparison of inflammatory changes by *Porphyromonas gingivalis* with

- distinct fimA genotypes in a mouse abscess model
Oral Microbiol. Immunol. 19, 205-209 (2004)
- DingMing H, XueDong Z, Kuboniwa M, Amano A
Separation of *Bacteroides forsythus* ATCC43037 proteins by horizontal two-dimensional gel electrophoresis
West China J Stomatol. 22, 177-179 (2004)
- Inaba H, Kawai S, Nakayama K, Okahashi N, Amano A
Effect of enamel matrix derivative on periodontal ligament cells in vitro is diminished by *Porphyromonas gingivalis*
J. Periodontol. 75, 858-865 (2004)
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T
Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*
Science 306, 1037-1040 (2004)
- Kawai S, Kato T, Inaba H, Okahashi N, Amano A
Odd-skipped related 2 splicing variants show opposite transcriptional activity
Biochem. Biophys. Res. Commun. 328, 306-311 (2005)
- Kato T, Amano A, Kamisaki Y, Morisaki I
Enhancement of nifedipine-induced gingival overgrowth by concomitant ketoconazole in rats
Pharmacology 74, 45-50 (2005)
- Ojima M, Takeda M, Yoshioka H, Nomura M, Tanaka N, Kato T, Shizukuishi S, Amano A
Relationship of periodontal bacterium genotypic variations with periodontitis in type 2 diabetic patients
Diabetes Care 28, 433-434 (2005)
- Nakagawa I, Amano A, Inaba H, Kawai S, Hamada S
Inhibitory effects of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae on interactions between extracellular matrix proteins and cellular integrins
Microbe. Infect. 7, 157-163 (2005)
- (2) 特許出願
H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）