

「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 前教授)

「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 17 年度は、本プロジェクトにより発見したオートファジーの新機能である異物排除についてさらに解析を進めた。その結果、細胞内に侵入した A 群レンサ球菌を捕獲するオートファゴソームの形成機構を一部解明し、また易凝集性の毒性たんぱく質 2 種類のオートファジーによる排除に関し、従来の説を覆す知見を得て、ひとつについては J. Biol. Chem.誌上で報告した。さらに、歯周病の原因菌 *P. gingivalis* の細胞内侵入機構を論文発表した。オートファジーを担う膜構造オートファゴソームの移動の分子メカニズムと機能的意義の検討や、エンドソームにおける選別輸送のメカニズムの解析も進展しており、今年度論文報告する予定である。その他の研究も進行中で、プロジェクトは極めて順調に展開しており、今後いっそうの成果が期待される。

2. 研究実施内容

[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 17 年度は、新たに発見したオートファジーの機能「病原性細菌や易凝集性たんぱく質の排除」について解析を進めると同時に、オートファゴソーム移動の分子機序を解明する等の進展があった。

- 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・分解されることを初めて見だし、2004 年末に報告した。菌を捕獲するオートファゴソームは、通常見られるものの 10 倍以上の大きさがあるが、電子顕微鏡及びビデオ蛍光顕微鏡による詳細な観察から、膜同士の融合により巨大化が起きることを示した。さらにこの巨大化に関与すると思われる複数の分子を同定した。それらの分子は、通常のオートファゴソーム形成には不要であるが、菌特異的オートファゴソームの形成には必須である。従って、Atg5 や LC3 等のオートファジーの基本的分子機構にさらに新たなシステムを上乗せするかたちで、菌排除に特化したオートファジーが進化上現れてきたものと思われる。また巨大オートファゴソームが形成されると、ある特定のオルガネラの分断化がおこることから、そのオルガネラがオートファゴソーム膜の供給源である可能性が出てきた。(吉森グループ&天野グループ)
- 2) 変性疾患：突然変異によって正常な立体構造をとることができず凝集塊を形成するようなたんぱく質はしばしば細胞毒性を持ち、変性疾患の原因となる(フォールディング病)。我々は、肝細胞の小胞体内に蓄積・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(ATZ) と、神経細胞の細胞質や核内で蓄積・凝集し神経変性を起こす延長ポリグルタミン含有たんぱく質(polyQ) をオートファジーが分解する事実をつきとめたが、17 年度にはそれらの分解が凝集塊形成以前に起こっていることを明らかにした。他のグループの報告では、オートファジーは異常たんぱく質の凝集塊を隔離・分解するとされているが、我々の発見はむしろ凝集していない状態のものがオートファジーを誘導し、それにより分解されていることを示しており、通説を覆す重要な成果である。ATZ については J. Biol. Chem. 誌上で報告し、polyQ については現在論文投稿中である。(吉森グループ)
- 3) オートファゴソームの移動：形成されたオートファゴソームが微小管に依存し細胞内を移動することを見いだした。この移動には、あるモーターたんぱく質が関与していた。我々が同定したオートファゴソーム膜結合タンパク質 LC3 がこのモーターたんぱく質と結合しており、かつオートファゴソームの移動に必要であった。LC3 は微小管に結合する能力も持つので、LC3 がオートファゴソーム移動の分子機構のアセンブリーを行っているのではないかと考えられる。LC3 は現時点で唯一のオートファゴソームマーカーとして広く用いられているが、その機能は分かっていなかった。今回役割の少なくともひとつはオートファゴソーム移動であることが判明した。オートファゴソームが細胞辺縁部で形成され、微小管に沿って移動し核近傍に到達しそこに集積しているリソソームと融合する模様も観察できた。移動を阻害すると融合が起らないことから、移動の意義はリソソームと出会い融合することにあると結論した。酵母ではオートファジーに微小管は不必要なので、体積が大きく偶然に両者が出会う確率

の低い哺乳類細胞に特有の機構だと思われる。(吉森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* の細胞内侵入機構に解析を加えた。*P. gingivalis* の細胞内侵入は、細菌表層の線毛と $\alpha 5 \beta 1$ integrin の結合により開始され、Lipid Raft/ コレステロール、ダイナミンなどに依存して本菌は細胞内侵入を果たす。さらに、*P. gingivalis* は微小管、アクトミオシン系を利用し細胞内移動を果たすことを発見した。また、*P. gingivalis* の細胞内侵入効率と、細胞内で発揮する細胞アポトーシス誘導能は、線毛遺伝子型の差異により大きく異なることを報告し、*P. gingivalis* の病原性の多寡を判定する臨床指標として線毛遺伝子型の判別が有用である可能性を示した。(吉森グループ&天野グループ)

[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17年度は、以下の成果を得ている。

- 1) 歯周病菌の細胞内侵入：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明らかにした。*P. gingivalis* の細胞内侵入は、細菌表層の線毛と $\alpha 5 \beta 1$ integrin の結合により開始され、Lipid Raft/コレステロール、ダイナミンなどに依存して本菌は細胞内侵入を果たす。さらに、*P. gingivalis* は微小管、アクトミオシン系を利用し細胞内移動を果たすことを発見した。これらの成果を論文発表した。また、*P. gingivalis* の細胞内侵入効率と、細胞内で発揮する細胞アポトーシス誘導能は、線毛遺伝子型の差異により大きく異なることを報告し、*P. gingivalis* の病原性の多寡を判定する臨床指標として線毛遺伝子型の判別が有用である可能性を示した。(吉森グループ&天野グループ)
- 2) エンドソームにおける選別：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。リソソームへの選別輸送のシグナルとなるユビキチン化と、選別後の脱ユビキチン化が、SKD1 や Cbl などの制御たんぱく質複合体のエンドソームにおける集合と離散のダイナミクスによりコントロールされていることを明らかにした。(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 (国立遺伝学研究所 前教授、(現 大阪大学、教授))

②研究項目：

- 1) オートファジーの分子機構と生理機能の解析

2) エンドソーム系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、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治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

(1) 論文（原著論文）発表

(吉森グループ)

- 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, Umebayashi 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. 280, 18283 - 18290 (2005)
- Hoshino M, Yoshimori T, Nakamura S
Small GTPase proteins Rin and Rit bind to Par6 GTP-dependently, and regulate cell transformation
J. Biol. Chem. 280, 22868-22874 (2005)
- Towns R, Kabeya Y, Yoshimori T, Guo C, Shangguan Y, Hong S, Kaplan M, Klionsky D J, Wiley J W
Sera from patients with type 2 Diabetes and Neuropathy Induce Autophagy and Colocalization with Mitochondria in SY5Y cells
Autophagy 1, 163-170 (2005)
- Mizuno E, Iura T, Mukai A, Yoshimori T, Kitamura N, Komada M.
Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes
Mol Biol Cell. 16, 5163-74 (2005)
- Egami Y, Kiryu-Seo S, Yoshimori T, Kiyama H.
Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons
Biochem Biophys Res Commun. 337, 1206-13 (2005)
- Kamimoto T, Shisako S, Hidvegi T, Mizushima N, Umebayashi K, Perlmutter D H, Yoshimori T.
Intracellular inclusions containing mutant α 1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity
J. Biol. Chem. 281, 4467-76 (2006) (Epub 2005 Dec 19)
- Tsuda K, Amano A, Umebayashi K, Inaba H, Nakagawa I, Nakanishi Y, Yoshimori T.
Molecular dissection of internalization of Porphyromonas gingivalis by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle
Cell Struct. Funct. 30, 81-91 (2005)

(天野グループ)

- Tamura K, Nakano K, Nomura R, Miyake S, Nakagawa I, Amano A, Ooshima T
Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in Japanese children and adolescents.
J. Periodontol. 76, 674-679 (2005)
- Kato T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Morisaki I, Amano A
Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the anti-epileptic drug phenytoin.
J. Periodontol. 76, 941-950 (2005)
- Inaba H, Tagashira M, Kanda T, Ohno T, Kawai S, Amano A
Apple- and hop-polyphenols protect periodontal ligament cells stimulated with enamel matrix derivative from *Porphyromonas gingivalis*.
J. Periodontol. 76, 2223-2229 (2005)
- Tsuda K, Amano A, Umebayashi K, Inaba H, Nakagawa I, Nakanishi Y, Yoshimori T
Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle.
Cell Struct. Funct., 30, 81-91(2005)
- Inaba H, Kawai S, Kato T, Nakagawa I, Amano A
Association between epithelial cell death and invasion by microspheres conjugated to *Porphyromonas gingivalis* vesicles with different types of fimbriae.
Infect. Immun. 74, 734-739 (2006)
- Akiyama S, Amano A, Kato T, Takada Y, Kimura KR, Morisaki I
Relationship of periodontal bacteria and *Porphyromonas gingivalis fimA* variations with phenytoin-induced gingival overgrowth.
Oral Dis. 12, 51-56 (2006)
- Takeda M, Ojima M, Yoshioka H, Inaba H, Kogo M, Shizukuishi S, Nomura M, Amano A
Relationship of serum advanced glycation end products with deterioration of periodontitis in type 2 diabetes patients.
J. Periodontol. 77, 15-20 (2006)
- Kawai S, Kato T, Sato M, Amano A
Odd-skipped related 2 gene transcription is regulated by CCAAT enhancer-binding protein $\square$ in mesenchymal C3H10T1/2 cells.
Genes Cells. 11, 163-175 (2006)
- Kato T, Okahashi N, Ohno T, Inaba H, Kawai S, Amano A
Effect of phenytoin on collagen accumulation by human gingival fibroblasts exposed to TNF- α *in vitro*.
Oral Dis. 12, 156-162 (2006)
- Ohno T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Shibata Y, Morisaki I, Abiko Y, Amano A
Proinflammatory gene expression in mouse ST2 osteoblast/stromal cell line in response to infection by *Porphyromonas gingivalis*.
Microbes Infect. in press (2006)
- Takemura A, Nakagawa I, Kawai S, Inaba H, Kato T, Hamada S, Amano A
Inhibitory effects of tumor necrosis factor- α on migration of human periodontal ligament cells.
J. Periodontol. in press (2006)