

「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

(大阪大学・微生物病研究所・環境応答研究部門 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。これまでに、エンドサイトーシス経路を介した歯周病菌の細胞内侵入機構の解明や、本来細胞の代謝に働くオートファジーが感染症や神経変性疾患において生体防御システムとしても機能していることを発見するなどの成果を得ている。

平成18年度は、オートファジーの分子機構の解明に大きな進展があった。まず、酵母では知られていたが動物では見つかっていなかった2つのベクリン結合たんぱく質を同定し、さらには動物にのみ存在する結合たんぱく質も見いだした。結果、ベクリンがオートファジーとエンドソーム系それぞれで機能する2種類の複合体を形成することが示唆された。また、Atg5 などを含むたんぱく質複合体が LC3 の脂質化の最終段階に働き、その脂質化 LC3 がオートファゴソーム膜の成長に必要であることを示した。また菌特異的な巨大なオートファゴソームの形成に rab7 による膜融合が関わることや、オートファジーが易凝集性たんぱく質による細胞死を防ぐことも明らかにした。エンドソーム系についても歯周病菌の侵入メカニズムに関する新たな知見を得た。プロジェクトは着実に進展しており、今後もこれまでの蓄積を生かしたさらなる発展が期待される。

## 2. 研究実施内容

### 1. オートファゴソーム形成の分子機構

ここ数年、世界におけるオートファジー研究は爆発的な進展を見せており、論文数も鰻上りの状況にある。しかしながら、その多くはオートファジーがある疾患や生理機能と関連があるという現象の記述であり、メカニズムに正面から取り組んだ報告はまだ少ない。分子基盤が不明のままでは、生体における役割の解明も早晚壁に突き当たることは火

を見るより明らかである。我々は、オートファジーの病的意義の解析と平行して、オートファジーを担う膜構造オートファゴソーム形成の分子機構の研究を進めており、最近重要な知見をいくつか得た。

1) ベクリン複合体： 酵母のタンパク質 **Vps30/Atg6** は、**Vps34**, **Vps15**, **Atg14** と複合体を作り オートファゴソーム形成に働く。一方 **Atg14** の代わりに **Vps38** がコンポーネントとなる複合体も存在し、その複合体はオートファジーではなく液胞への輸送経路で機能することが知られている。すなわち、**Vps30/Atg6** (及び **Vps34** と **Vps15**) は **bi-functional** なタンパク質と考えられる。哺乳動物では **Vps30/Atg6** のホモログである **Beclin** が、III 型 **PI3** キナーゼ (**Vps34** ホモログ) と **p150** (**Vps15** ホモログ) と複合体を作りオートファジーに働くことは判明しているが、**Atg14** や **Vps38** のホモログは見つかっておらず、**Beclin** は酵母と異なりオートファジー機能しかもたないとされてきた。しかし我々は、**Beclin** 結合タンパク質の探索及び質量分析から、**Atg14** と **Vps38** の哺乳類ホモログを同定し、その解析により酵母同様哺乳類でも **Beclin-Atg14-PI3K-p150** と **Beclin-Vps38-PI3K-p150** の2種類の複合体が存在することを見いだした (図1)。さらに後者には、酵母には無い新規タンパク質が含まれており、その過剰発現はエンドサイトーシス経路の異常を引き起こした。酵母が持つ仕組みを基本とするものの、さらに進化したメンブレントラフィックの制御機構が哺乳類に存在するものと思われる。(吉森グループ)



図1 2つのベクリン複合体 「ミッシングリンク」であった **Atg14** と **Vps38** の哺乳類ホモログを同定し、第2の複合体の存在を明らかにした。そこには酵母には無い新たなタンパク質コンポーネントも含まれていた。

2) **Atg12** 結合系と **LC3** 結合系のクロストーク： オートファゴソームの形成には **Atg12** 結合系、**LC3** 結合系の2つのユビキチン様反応系が必須である。**Atg12** 結合系に不全があると **LC3** 結合系の産物 **LC3-PE** (**LC3** に脂質であるフォスファチジルエタノールアミン [PE] が共有結合している) の形成が著しく低下する。これより、これら2つの結合系にはクロストークがあると考えられるがその詳細は不明であった。我々は、各 **Atg** の過剰発現による優勢阻害効果の解析から、**Atg12** 結合系の最終産物である **Atg12-5/16L** 複合体が、**LC3** を **Atg3**(**LC3** の **E2** 酵素)から **PE** へ転移する段階で働く **E3** 様因子であり、その反応には **Atg16L** が未知の因子 **X** を介して膜と結合する必要があることを示唆する結果を得た。(吉森グループ)

## 2. オートファジーによる生体防御

オートファジーでは、隔離膜と呼ばれる膜が他のオルガネラや細胞質の一部を囲い込みながらオートファゴソームを形成する。完成したオートファゴソームはリソソームと融合し、その結果内容物が消化される。日常的に細胞成分の代謝回転に寄与すると共に、飢餓時には著しく亢進し生存に必要なアミノ酸源確保に働くことが知られている。我々はオートファジーが、細胞内に侵入した病原性細菌や神経変性疾患などを引き起こす易凝集性タンパク質の排除という生体防御機能も持つことを見いだした。その後、生体防御システムとしてのオートファジーについて詳細な解析を行い、新たな成果を得ている。

1) 細胞質に侵入した A 群レンサ球菌の排除： 咽頭炎など種々の疾患の原因となる A 群レンサ球菌は、エンドサイトーシス経路から細胞質に侵入するが、オートファジーによってほとんどが殺される。菌の細胞質への出現が引き金となって、連鎖した菌を特異的に囲い込む巨大なオートファゴソームが形成される点が通常のオートファジーとは異なる。今

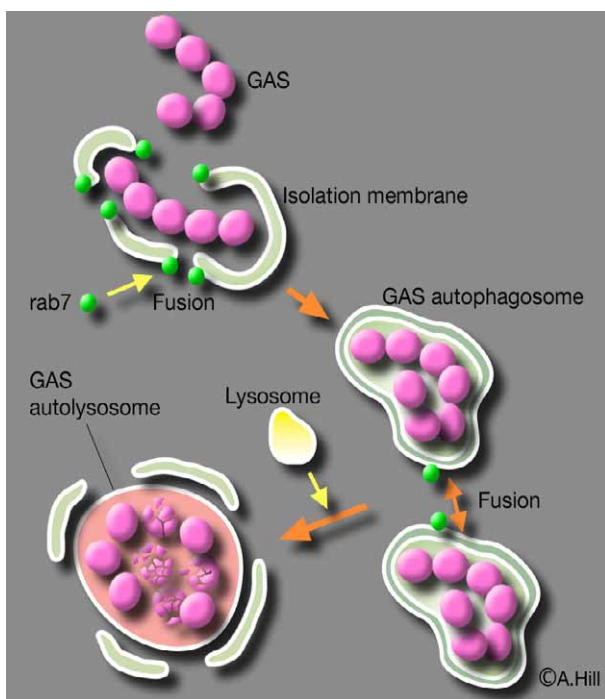


図2 Rab7 による巨大オートファゴソーム形成

連鎖する菌 (GAS) を包み込むため隔離膜同士が融合する。融合には Rab7 が必須であった。完成したオートファゴソーム同士も融合するのでさらに巨大化する。

回我々は、菌感染時に通常の10倍以上のサイズのオートファゴソームが形成されるメカニズムを明らかにした。メンブレントラフィックの制御因子である Rab GTPase ファミリーの一員の Rab7 によって、菌の鎖の周囲に形成された複数の隔離膜同士が融合し、通常のオートファゴソームでは不可能な長い菌鎖の囲い込みが行われていた。Rab7 は通常のオートファゴソーム形成には必須ではない。進化の過程で、従来用いられていなかった分子装置の付加により感染防御に特化したオートファジーの亜種が生じたのであろう。また、オートファゴソーム膜の由来が長年論争になっているが、菌特異的な巨大オートファゴソームの場合、ゴルジ体からの膜供給があることをゴルジ体のたんぱく質と脂質マーカの観察から突き止めた。現在さらに解析を進めている。(吉森グループ&天野グループ)

2) 易凝集性タンパク質が引き起こす変性疾患の抑制： 神経変性を来すハンチ

ントン舞踏病等のいわゆるポリグルタミン病は、通常より長いポリグルタミン鎖を含むために細胞内で凝集するようになった異常タンパク質 (PolyQ) の発現により発症する。我々

は既に、PolyQ 凝集体そのものの分解よりむしろ凝集していない（あるいは微小な凝集体を形成している）段階でオートファジーが素早く誘導されるという通説を覆す事実を発見している。さらに通説の根拠となっている凝集体とオートファゴソームマーカーである LC3 との共局在を示す蛍光顕微鏡イメージが、LC3 たんぱく質が凝集体に巻き込まれた結果であり、オートファゴソーム膜は存在しないことを明らかにした。また、PolyQ 発現による細胞死が、Atg5 遺伝子破壊によりオートファジー不能となった細胞で亢進することを見だし、オートファジーが変性疾患防御に働く可能性を示した。（吉森グループ）

### 3. エンドソーム系を介した歯周病細菌の細胞内侵入

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。一方、種々の病原体はエンドソームを介して細胞内に侵入する。この病原体侵入のメカニズムを明らかにすることは、細胞内侵入性病原性による感染症の発症機序を探る為に不可欠なことである。平成18年度は、以下の成果を得た。

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* の細胞内侵入機構の詳細を明らかにした。*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る。 $\alpha 5\beta 1$ -integrin は *P. gingivalis* の細胞付着にのみ関与し、本菌の細胞内侵入は Lipid Raft に依存しておこる。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。これまで微小管は細胞内に取り込まれた物質の細胞内輸送に用いられる「レール」として機能することは知られていたものの、微小管の重合・脱重合といったダイナミクスが細胞内細菌の移動に必要であるという知見は初めてのものである。（吉森グループ&天野グループ）

2) *P. gingivalis* の細胞周期への影響：*P. gingivalis* の細胞内侵入効率は本菌の線毛遺伝子型に依存している。GeneChip マイクロアレイを用いて感染細胞の遺伝子発現変化を解析したところ、本菌の細胞内侵入に伴い、細胞周期の遅延が推測されたため、更に種々の検討を加えた。その結果、*P. gingivalis* に特徴的な protease が細胞周期を G1 arrest に誘導することが示された。（天野グループ）

## 3. 研究実施体制

### (1) 吉森グループ

#### ①研究者名

吉森 保（大阪大学 教授）

#### ②研究項目

- ・オートファジーの分子機構と生理機能の解析
- ・エンドソーム系の分子機構と生理機能の解析

(2)「天野」グループ

①研究者名

天野 敦雄 (大阪大学 教授)

②研究項目

・ 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

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

吉森グループ

- Birmingham C L, Smith A C, Bakowski M A, Yoshimori T, Brumell J H.  
Autophagy Controls Salmonella Infection in Response to Damage to the Salmonella-containing Vacuole.  
*J. Biol. Chem.* 281, 11374-83 (2006) (Epub 2006 Feb 22)
- Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, Macdonald M, Yankner B, Yuan J.  
Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1.  
*J. Biol. Chem.* 281, 14474-14485 (2006) (Mar 6; Epub ahead of print)
- Shim J H, Xiao C, Hayden M S, Lee K Y, Trombetta E S, Pypaert M, Nara A, Yoshimori T, Wilm B, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hogan B L, Mellman I, Ghosh S.  
CHMP5 is essential for late endosome function and down-regulation of receptor signaling during mouse embryogenesis.  
*J. Cell Biol.* 172, 1045-56 (2006)
- Nakashima A, Tanaka N, Tamai K, Kyuuma M, Ishikawa Y, Sato H, Yoshimori T, Saito S, Sugamura K.  
Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy.  
*Virology.* 349, 254-263 (2006) [Epub 2006 Apr 27]
- Ohsaki Y, Sugimoto Y, Suzuki M, Hosokawa H, Yoshimori T, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H.  
Cholesterol depletion facilitates ubiquitylation of NPC1 and its association with SKD1/Vps4.  
*J Cell Sci.* 119, 2643-2653 (2006) [Epub ahead of print, Jun 6]
- Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, Yoshimori T, Morris AP, Estes MK.  
Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasms.  
*J Virol.* 80, 6061-6071 (2006)
- Szeto J, Kaniuk NA, Canadien V, Nisman R, Mizushima N, Yoshimori T, Bazett-Jones DP, Brumell JH.  
ALIS are Stress-Induced Protein Storage Compartments for Substrates of the Proteasome and

Autophagy.

*Autophagy* 2, 189-99 (2006) [Epub 2006 Jul 22]

- Kato T, Kawai S, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Nakagawa I, Tsuda K, Omori H, Ooshima T, Yoshimori T, Amano A.  
Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype.  
*Cell Microbiol.* 9, 753-65 (2007) Epub 2006 Nov 1.
- Arasaki K, Tani K, Yoshimori T, Stephens DJ, Tagaya M.  
Nordihydroguaiaretic acid affects multiple dynein-dynactin functions in interphase and mitotic cells.  
*Mol Pharmacol.* 71, 454-60 (2007) Epub 2006 Nov 14.
- Gutierrez MG, Saka HA, Chinen I, Zoppino FCM, Yoshimori T, Bocco JL, Colombo MI.  
Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1829-1834 (2007)
- Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, Elsasser HP, Schatzl HM.  
The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy.  
Leukemia. 2007 Mar 1; [Epub ahead of print]

天野グループ

- 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, 734-9 (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, 51-6 (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 d in mesenchymal C3H10T1/2 cells.  
*Genes Cells.* 11, 163-75 (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- $\alpha$  *in vitro*.  
*Oral Dis.* 12, 156-62 (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.* 8, 1025-34 (2006)
- Takemura A, Nakagawa I, Kawai S, Inaba H, Kato T, Hamada S, Amano A.  
Inhibitory effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on migration of human periodontal ligament cells.  
*J. Periodontol.* 77, 883-90 (2006)
- Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A.  
Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct fimbria types of *Porphyromonas gingivalis*.  
*Infect. Immun.* 74, 3773-82 (2006)
- Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, Taniguchi K, Takeda M, Yoshioka H, Amano A, Ooshima T.  
Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis.  
*J. Med. Microbiol.*, 55, 1135-40 (2006)
- Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, Matsue H, Takahashi T, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.  
Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens.  
*J. Clin. Microbiol.* 44, 3313-7 (2006)
- Davila-Perez C, Amano A, Alpuche-Solis AG, Patiño-Marin N, Pontigo-Loyola AP, Hamada S, Loyola-Rodriguez JP.  
Distribution of genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in type 2 diabetic patients with periodontitis in Mexico.  
*J. Clin. Periodontol.* 34, 25-30 (2007)
- Kato T, Kawai S, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Nakagawa I, Tsuda K, Oomori H, Ooshima T, Yoshimori T, Amano A.  
Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype.  
*Cell. Microbiol.* 9, 753-65 (2007)
- Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Tamura K, Miyamoto E, Yoshioka H, Taniguchi K,

Amano A, Ooshima T.

Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in cardiovascular specimens from Japanese patients.

*Oral Microbiol. Immunol.* 22, 136-9 (2007)

- Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Homma H, Yoshioka H, Shudo Y, Hata H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.

Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients.

*J. Med. Microbiol.* 56, 551-6 (2006)

- Inaba H, Nakano K, Kato T, Nomura R, Kawai S, Kuboniwa M, Ishihara K, Ooshima T, Amano A.

Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae.

*Oral Microbiol. Immunol.* in press (2007)

- Ohno T, Okahashi N, Morisaki I, Amano A.

Signaling pathways in osteoblast proinflammatory responses to infection by *Porphyromonas gingivalis*.

*Oral Microbiol. Immunol.* in press (2007)

## (2) 特許出願

吉森グループ

平成 18年度特許出願:0件 (CREST 研究期間累積件数:0件)

天野グループ

平成 18年度特許出願:1 件 (CREST 研究期間累積件数:2件)